

Université de Montréal

**Modulation des cytochromes P450 par l'hypoxie :
médiateurs et mécanismes d'action**

Par
Caroline Fradette

Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (PhD)
En Pharmacologie

Juillet 2003

© Caroline Fradette, 2003



W

4

U58

2004

V.005

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Modulation des cytochromes P450 par l'hypoxie :
médiateurs et mécanismes d'action

présentée par :

Caroline Fradette

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Pierre Villeneuve, président-rapporteur

Patrick du Souich, directeur de recherche

Albert Adam, membre du jury

Alan Anderson, examinateur externe

France Varin, représentante du doyen de la FES

Résumé

Des études *in vivo* avec des lapins ont montré que l'hypoxie aiguë diminue la clairance de médicaments dont la biotransformation est réalisée par les cytochromes CYP1A1 et 1A2 du cytochrome P450 et augmente l'expression du CYP3A6, ainsi que la peroxydation des lipides (Barakat et du Souich, 1996; Kurdi et coll., 1999; Galal et du Souich, 1999). Les mécanismes sous-jacents à ces changements d'expression des cytochromes P450 par l'hypoxie demeurent incompris.

L'objectif général de mon projet de recherche était de caractériser les effets de l'hypoxie sur le cytochrome P450. En premier lieu, nous avons émis l'hypothèse que l'hypoxie pouvait induire la formation de médiateurs sériques responsables des changements d'activité et d'expression du cytochrome P450. *In vitro*, l'incubation de sérum provenant de lapins présentant de l'hypoxie diminue l'activité, la quantité d'ARNm et l'expression des CYP1A1 et CYP1A2, tout en augmentant l'activité, la quantité d'ARNm et l'expression du CYP3A6 dans les hépatocytes de lapins. Ces résultats démontrent que le sérum de lapins avec de l'hypoxie contient des médiateurs capables de moduler l'activité et l'expression des cytochromes P450.

La présence de cytokines a souvent été associée aux changements d'activité et d'expression du cytochrome P450. L'hypoxie induit le relargage de plusieurs cytokines (Lacombe & Mayeux, 1999). En conséquence, nous avons émis l'hypothèse que les médiateurs sériques étaient des cytokines qui seraient responsables des modifications des cytochromes P450 provoquées par l'hypoxie. L'objectif du projet était d'identifier

dans le sérum provenant de lapins soumis à de l'hypoxie les médiateurs responsables de l'inactivation et de la régulation négative des CYP1A1 et 1A2, ainsi que de l'induction du CYP3A6. Dans notre modèle d'hypoxie, l'IFN- γ (l'interféron-gamma), l'IL-1 β (l'interleukin-1bêta) et l'IL-2 (l'interleukin-2) sont responsables de la diminution de l'activité et de l'expression des CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6, alors que l'érythropoïétine contribue à l'induction du CYP3A6.

Les médiateurs sériques ayant été identifiés, l'objectif suivant était de caractériser, dans les hépatocytes de lapins, les voies de signalisation menant aux changements d'expression des cytochromes P450, particulièrement du CYP3A6, par l'hypoxie et par le sérum provenant de lapins soumis à de l'hypoxie. Dans ce projet de recherche, nous avons étudié le rôle du "hypoxia inducible factor-1" (HIF-1) et de "l'activator protein-1 complex" (AP-1), les plus importants facteurs de transcription activés par l'hypoxie, ainsi que le rôle du "pregnane X receptor" (PXR) et du "constitutively activated receptor" (CAR), deux récepteurs nucléaires responsables de l'induction du CYP3A6 par les xénobiotiques, dans les changements des cytochromes P450 produits par l'hypoxie et par le sérum provenant de lapins avec de l'hypoxie.

Nous avons démontré que l'hypoxie *in vivo* induit l'expression de CAR de même que sa liaison au promoteur du *CYP3A6*, sans avoir d'effet sur PXR. De plus, l'hypoxie *in vivo* et le sérum provenant de lapins avec de l'hypoxie augmentent l'expression du CYP3A6, de HIF-1 α et de c-jun, un des constituants de AP-1, ainsi que la liaison de HIF-1 et AP-1 au promoteur du *CYP3A6*. La transactivation du gène

CYP3A6 par HIF-1 et AP-1 requiert une phosphorylation dépendante de l'activation de la PTK et de la MAPK p42/p44.

Récemment, il a été proposé que les enzymes du cytochrome P450 pourraient contribuer à la formation d'oxyde nitrique (NO^\bullet) (Morgan et coll., 2001). En nous basant sur ce postulat, nous avons émis l'hypothèse que l'induction de l'expression du CYP3A6 par l'hypoxie avait pour conséquence d'augmenter la production de NO^\bullet . L'objectif du dernier projet de recherche était de déterminer si le cytochrome P450 peut générer du NO^\bullet et à partir de quel substrat.

La sérotonine est transformée en molécules inactives majoritairement par la monoamine oxydase A (MAO A). Cependant, il existe des données suggérant que la sérotonine pourrait aussi être biotransformée par d'autres systèmes enzymatiques. Nous avons émis l'hypothèse que les cytochromes P450 pourraient biotransformer la sérotonine afin de générer du NO^\bullet . L'objectif de ce projet était donc de vérifier si les enzymes du cytochrome P450, entre autres le CYP3A6, contribuent à la formation de NO^\bullet , de caractériser les cytochromes P450 participant au métabolisme de la sérotonine et puis finalement, d'élucider les mécanismes sous-jacents à la formation de NO^\bullet par le cytochrome P450. En résumé, nous avons démontré que les CYP2B6, CYP2C9 et CYP2C19 biotransforment la sérotonine en hydroxylamine qui est ensuite convertie en NO^\bullet en présence de catalase.

Mots-clés : Cytochrome P450, hypoxie, cytokines, activité, expression, HIF-1, AP-1, MAPKs, sérotonine, monoxyde d'azote.

Abstract

In vivo, in the rabbit, acute hypoxia regulates the cytochrome P450, e.g. it decreases the expression of CYP1A1 and CYP1A2 and as a consequence, the rate of hepatic biotransformation of drugs eliminated through these isoforms is reduced. On the other hand, hypoxia increases CYP3A6 expression and hepatic lipid peroxidation (Barakat et du Souich, 1996; Kurdi et al., 1999; Galal et du Souich, 1999).

The general objective of my research project was to characterize the effect of hypoxia on the cytochrome P450. We hypothesized that hypoxia triggers the release of serum mediators eventually leading to changes in cytochrome P450 activity and expression. *In vitro*, incubation of serum from rabbits subjected to hypoxia reduces the hepatic activity, amount of mRNAs and expression of CYP1A1 and CYP1A2, and increases CYP3A6 expression through a pretranslational mechanism. These data indicate that serum from rabbits subjected to hypoxia contains mediators capable to modulate the activity and expression of cytochrome P450 isoforms.

Cytokines have been associated with changes in cytochrome P450 activity and expression. Hypoxia prompts the release of numerous cytokines (Lacombe & Mayeux, 1999). Hence, we speculated that the serum mediators responsible for the changes in hepatic P450 isoforms in rabbits with hypoxia were cytokines. The objective of the project was to identify the serum mediators responsible for CYP1A1 and CYP1A2 inactivation and down-regulation, as well as for CYP3A6 up-regulation. The serum mediators implicated in the decrease in activity and expression of cytochrome P450 isoforms CYP1A1 and CYP1A2 were interferon- γ (IFN- γ), interleukin-1 β (IL-1 β) and

IL-2, whereas erythropoietin (Epo) was partly responsible for the increase in CYP3A6 expression.

Having identified the serum mediators, the next step was to investigate the signal transduction pathways involved in the changes of cytochrome P450 isoforms expression, especially CYP3A6 induction, produced by hypoxia and by serum from rabbits with hypoxia. In this research project, we have studied the role of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1), activator protein-1 (AP-1), the most important transcription factors activated by hypoxia, of constitutively activated receptor (CAR), and pregnane X receptor (PXR), two “orphan” nuclear receptors responsible for CYP3A6 induction by xenobiotics, in the regulation of cytochrome P450 by hypoxia and by serum from rabbits with hypoxia.

The results demonstrate that *in vivo* hypoxia induces CAR as well as its binding to *CYP3A6* promoter, but not PXR. Moreover, hypoxia *in vivo* and serum from rabbits with hypoxia *in vitro* increased the expression of HIF-1 α , c-jun, and CYP3A6. Hypoxia *in vivo* and the serum *in vitro* also prompted the binding of HIF-1 and AP-1 to *CYP3A6* promoter. Briefly, hypoxia *in vivo* and serum from rabbits subjected to hypoxia induce The increase in expression of CYP3A6 depends upon the activation of HIF-1 and/or AP-1 by PTK- and p42/44 MAPK.

It has been proposed that cytochrome P450 enzymes could contribute to nitric oxide (NO \bullet) formation (Morgan et coll., 2001). We have speculated that CYP3A6 induction by hypoxia aimed to increase NO \bullet production. Hence, the project objective

was to assess whether cytochrome P450 generates NO[•] and from which substrate. On the other hand, serotonin (5-HT) is believed to be primarily metabolized by monoamine oxidase A. However, there is indirect data suggesting that 5-HT may also be biotransformed by other enzymatic systems. Therefore, we hypothesized that 5-HT is biotransformed by cytochrome P450 isoforms, generating NO[•]. The last project aimed to confirm that cytochrome P450 enzymes, especially CYP3A6, contribute to NO[•] formation, to assess which isoforms are implicated in 5-HT metabolism and finally, to characterize the steps involved in NO[•] formation by cytochrome P450. We have shown that CYP2B6, CYP2C9 and CYP2C19 biotransform 5-HT yielding hydroxylamine which is converted to NO[•] in presence of catalase.

Keywords : Cytochrome P450, hypoxia, cytokines, activity, expression, HIF-1, AP-1, MAPKs, serotonin, nitric oxide.

Table des matières

Liste des tableaux	xiv
Liste des figures.....	xv
Liste des abréviations	xix

PREMIÈRE PARTIE : REVUE DE LA LITTÉRATURE

Introduction	2
CHAPITRE 1 : L'HYPOXIE	5
1.1 Définition.....	6
1.2 HIF-1 : régulateur central de l'hypoxie	8
1.3 Les médiateurs de l'hypoxie.....	14
1.3.1 Les cytokines.....	14
1.3.2 Le facteur de transcription AP-1	18
1.3.3 Les substances oxygénées réactives (SOR)	19
CHAPITRE 2 : LE CYTOCHROME P450	23
2.1 Définition et historique.....	24
2.2 Mécanisme d'action du cytochrome P450.....	27
2.3 Les familles et sous-familles du cytochrome P450	33
2.3.1 La famille du CYP1	34
2.3.2 La famille du CYP2	36
2.3.3 La famille du CYP3	41
2.3.4 La famille du CYP4	42
CHAPITRE 3 : LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION ET DE L'ACTIVITÉ DES CYTOCHROMES P450.....	44
3.1 Les facteurs reliés à l'individu	45
3.2 La régulation intracellulaire de l'expression et de l'activité du cytochrome P450	49
CHAPITRE 4 : EFFET DE L'HYPOXIE SUR LE CYTOCHROME P450.....	57
4.1 Études chez l'animal.....	59
4.2 Effet de l'hypoxie sur les cytochromes P450	60
4.2.1 Effet de l'hypoxie sur l'activité des cytochromes P450.....	60

4.2.2 Effet de l'hypoxie sur l'expression des cytochromes P450	62
4.3 Les mécanismes de régulation du cytochrome P450 lors d'hypoxie	62
CHAPITRE 5 : LE RÔLE PHYSIOLOGIQUE DU CYTOCHROME P450.....	64
5.1 Le métabolisme des hormones.....	66
5.2 Le métabolisme des acides gras.....	67
5.3 Le monoxyde d'azote (oxyde nitrique, NO [•]).....	68
Objectifs des travaux de doctorat	75

DEUXIÈME PARTIE : PRÉSENTATION DES ARTICLES

CHAPITRE 6 : HYPOXIA-INDUCED DOWN REGULATION OF CYP1A1/1A2 AND UP-REGULATION OF CYP3A6 INVOLVES SERUM MEDIATORS	80
Abstract.....	81
Introduction.....	83
Materials and Methods	85
Animals and hepatocyte collection	85
Rabbit serum preparation.....	86
Fractionation of serum proteins	86
Experimental protocol.....	88
Western blot analysis	89
Northern blot analysis	90
Immuno-neutralisation of cytokines	91
Drugs and chemicals	92
Statistical analysis.....	93
Results.....	94
Effect of hypoxia <i>in vivo</i> on hepatic P450 content, activity and amount of P450 isoforms	94
Effect of S _{CONT} and serum of rabbits with hypoxia (S _{HYP} O) on H _{CONT} following 4 and 24 h of incubation	94
Effect of S _{CONT} and S _{HYP} O on H _{HYP} O following 4 and 24 h of incubation	95
Effect of HPLC fractions of S _{HYP} O on P450 content, activity and isoforms of H _{HYP} O following 4 and 24 h of incubation.....	96

Identification of the mediators in S_{HYP0} responsible for the changes in the amount and activity of P450	97
Discussion.....	99
Acknowledgements.....	105
References.....	106
CHAPITRE 7 : HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR-1 AND ACTIVATOR PROTEIN-1 MODULATE HYPOXIA-INDUCED UP-REGULATION OF CYP3A6	
Abstract.....	125
Introduction.....	127
Materials and Methods	129
Animals and hepatocyte collection	129
Rabbit serum preparation.....	130
CYP3A6 activity.....	131
Western blot analysis	131
Analysis of the <i>CYP3A6</i> 5' region.....	132
Preparation of Nuclear Extracts.....	133
Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSAs)	133
Drugs and chemicals.....	134
Statistical analysis.....	134
Results.....	136
Effect of hypoxia in vivo on CYP3A6, HIF-1 α and c-jun	136
Effect of S_{HYP0} , CoCl ₂ and lead acetate in vitro on CYP3A6, HIF-1 and AP-1.....	136
Signal transduction pathways implicated in CYP3A6 up-regulation	137
Effect of hypoxia in vivo and of S_{HYP0} on CAR and PXR expression.....	138
Effect of hypoxia in vivo, and of S_{HYP0} , CoCl ₂ and lead acetate in vitro on CYP1A1 and 1A2 expression	139
Discussion.....	140
Acknowledgements.....	146
References.....	147
CHAPITRE 8 : SEROTONIN IS BIOTRANSFORMED BY CYP2C9, 2C19	

AND 2B6 IN HYDROXYLAMINE WHICH IS CONVERTED INTO NITRIC OXIDE	161
Abstract.....	162
Introduction.....	164
Materials and Methods	166
Animals and hepatocyte collection	166
Experimental protocols	166
Western blot analysis	167
5-HT and 5-HIAA assay	168
NO [•] and hydroxylamine assays.....	168
Functional studies in isolated organ bath.....	168
Drugs and chemicals	169
Calculation of the maximal effect and statistical analysis.....	169
Results	171
Biotransformation of serotonin	171
1. Rabbit's hepatocytes	171
2. Human recombinant isoforms	172
NO [•] production	172
Dynamic studies.....	173
Vasorelaxant effect of serotonin metabolite	173
Characterisation of the mechanism underlying the vasorelaxation induced by serotonin.....	174
Discussion	177
Acknowledgments	181
References	182

TROISIÈME PARTIE : DISCUSSION ET CONCLUSION

Discussion	195
I- Régulation des cytochromes P450	199
A- Facteurs qui régulent l'activité des CYP1A1 et 1A2.....	200
B- Facteurs qui régulent l'expression des CYP1A1 et 1A2	206

C- Facteurs qui régulent l'expression du CYP3A6.....	215
II- Mécanismes sous-jacents à la régulation de l'expression du cytochrome P450 par d'autres pathologies : différences avec l'hypoxie	223
III- La production de NO [•] , un nouveau rôle physiologique du cytochrome P450?	228
Conclusion.....	240
Références	245

Liste des tableaux

Tableau 1.1	Gènes régulés au niveau transcriptionnel par HIF-1	12
Tableau 1.2	Les cytokines produites par l'organisme en présence d'hypoxie et leurs fonctions	17
Tableau 6.1	Effect of 48 h hypoxia <i>in vivo</i> and of the incubation of control hepatocytes with serum of control and hypoxic rabbits for 4 and 24 h on P450 content and metabolism of theophylline	112
Tableau 6.2	Effect of the incubation of hepatocytes from hypoxic rabbits with serum from control and hypoxic rabbits for 4 and 24 h on P450 content and metabolism of theophylline	113
Tableau 9.1	Enzymes impliquées dans le métabolisme de la sérotonine.....	236

Liste des figures

Figure 1.1	Activation de HIF-1.....	10
Figure 2.1	Exemples des différentes voies de biotransformation par le système des mono-oxygénases à fonction mixte	29
Figure 2.2	Réaction d'hydroxylation catalysée par le cytochrome P450.....	33
Figure 3.1	Mécanisme d'induction par les récepteurs nucléaires	53
Figure 5.1	Biosynthèse du NO* à partir de la L-arginine	70
Figure 5.2	NO* : biosynthèse par la cellule endothéliale et effets sur la fibre lisse	72
Figure 6.1	Effect (A) of 48 h acute moderate hypoxia <i>in vivo</i> on the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins in hepatocytes and (B) of serum from rabbits with acute moderate hypoxia (S _{HYP} O) on the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins in hepatocytes from rabbits with acute moderate hypoxia (H _{HYP} O).	114
Figure 6.2	Effect (A) of <i>in vivo</i> 48 h acute moderate hypoxia on the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 mRNA in hepatocytes of control rabbits (H _{CONT}) and rabbits subjected to hypoxia (H _{HYP} O); (B) effect of serum from control rabbits (S _{CONT}) and rabbits with acute moderate hypoxia (S _{HYP} O) on the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 mRNA incubated for 24 h with hepatocytes from control rabbits (H _{CONT}) and (C) effect of S _{CONT} and S _{HYP} O on the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 mRNA incubated for 24 h with hepatocytes from rabbits with hypoxia (H _{HYP} O).....	115
Figure 6.3	Effect of serum of control rabbits (S _{CONT}), serum from rabbits with acute moderate hypoxia (S _{HYP} O), and HPLC fractions of S _{HYP} O incubated for 24 h with hepatocytes from rabbits with acute moderate hypoxia on the formation of theophylline metabolites.....	116
Figure 6.4	Effect of serum of control rabbits (S _{CONT}), serum from rabbits with acute moderate hypoxia (S _{HYP} O), and HPLC fractions of S _{HYP} O incubated for 24 h with hepatocytes from rabbits with acute moderate hypoxia on cytochrome P450 content.	117
Figure 6.5	Effect of serum of control rabbits (S _{CONT}), serum from rabbits with acute moderate hypoxia (S _{HYP} O), and HPLC fractions of S _{HYP} O incubated for 24 h with hepatocytes from rabbits with acute moderate hypoxia on the formation of theophylline metabolites.....	118

Figure 6.6	Effect of serum of control rabbits (S_{CONT}), serum from rabbits with acute moderate hypoxia (S_{HYPO}), and HPLC fractions of S_{HYPO} on the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins in hepatocytes from rabbits with acute moderate hypoxia (H_{HYPO}) following 24 h incubation.....	119
Figure 6.7	Effect of anti-cytokine antibodies on the ability of the 65-94 kDa and 15-23 kDa serum fractions to modify the formation of theophylline metabolites incubated for 4 h with hepatocytes from rabbits with acute moderate hypoxia.	120
Figure 6.8	Effect of anti-cytokine antibodies on the ability of the 32-44 kDa and 15-23 kDa serum fractions to modify P450 content incubated for 24 h with hepatocytes from rabbits with acute moderate hypoxia.	121
Figure 6.9	Effect of anti-cytokine antibodies on the ability of the 65-94 kDa and 15-23 kDa serum fractions to modify the formation of theophylline metabolites incubated for 24 h with hepatocytes from rabbits with acute moderate hypoxia.	122
Figure 6.10	Effect of anti-cytokine antibodies on the ability of 32-44 kDa and 15-23 kDa serum fractions to modify the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins incubated for 24 h with hepatocytes from rabbits with acute moderate hypoxia.	123
Figure 7.1	Effect of moderate hypoxia for 48 h <i>in vivo</i> on CYP3A6, HIF-1 α and c-jun expression in rabbit hepatocytes, and HIF-1 and AP-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe.	152
Figure 7.2	Average amounts of CYP3A6, HIF-1 α and c-jun in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) incubated for 24 h with serum from rabbits with moderate hypoxia (S_{HYPO}), CoCl_2 and lead acetate, representative blots of these proteins.....	153
Figure 7.3	Effect of serum from control rabbits (S_{CONT}) and from rabbits with moderate hypoxia (S_{HYPO}), CoCl_2 (panel A), and lead acetate (panel B) on HIF-1 and AP-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe..	154
Figure 7.4	Effect of serum on CYP3A6 and HIF-1 α expression, and HIF-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe in presence of protein kinase inhibitors.....	155
Figure 7.5	Effect of CoCl_2 on CYP3A6 and HIF-1 α expression and HIF-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe in presence of protein kinase inhibitors.....	156
Figure 7.6	Effect of serum on CYP3A6 and c-jun expression, and AP-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe in presence of protein kinase inhibitors	157

Figure 7.7	Effect of lead acetate on CYP3A6 and c-jun expression, and AP-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe in presence of protein kinase inhibitors.....	158
Figure 7.8	Effect of hypoxia <i>in vivo</i> and of serum from rabbits with moderate hypoxia (S_{HYPO}) on constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR) expression, and CAR binding to CYP3A6 oligonucleotide probe.	159
Figure 7.9	Average amount of CYP1A1 and CYP1A2 in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}), from rabbits with moderate hypoxia (H_{HYPO}), and in H_{CONT} incubated for 24 h with serum from control rabbits (S_{CONT}) and from rabbits with moderate hypoxia (S_{HYPO}), with $CoCl_2$, and with lead acetate and representative blots of CYP1A1 and CYP1A2.....	160
Figure 8.1	a. Immunoblot analysis of CYP1A1/1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A6 and NOS2 in rabbit's hepatocytes incubated for 24 and 72 h. b. Immunoblot analysis of CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 and NOS2 in rabbit's hepatocytes following 72 h incubation with rifampicin (RIF, 10 μM) and phenobarbital (PB, 125 μM)	188
Figure 8.2	5-Hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) concentrations following 4 h of incubation of increasing concentrations of 5-hydroxytryptamine (5-HT) with control hepatocytes and hepatocytes exposed for 72 h to ketoconazole (50 μM), chlorgyline (25 μM), rifampicin (10 μM), and phenobarbital (125 μM).....	189
Figure 8.3	Formation of 5-hydroxyindole acetic acid by human recombinant CYP2B6, CYP2C9 and CYP2C19 after incubation with 5-hydroxytryptamine (5-HT, 100 μM) alone or in presence of ketoconazole (KTZ, 50 μM), omeprazole (OME, 50 μM), and β -phenylethyl isothiocyanate (PEITC, 50 μM)	190
Figure 8.4	a. Predicted maximal concentrations of baseline NO^* (C_{max}) in hepatocytes incubated for 72 h	191
Figure 8.5	a. Concentration-response curves of the relaxation induced by 5-hydroxytryptamine (5-HT) in presence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2C19 in endothelium-denuded aortic rings precontracted with phenylephrine (PE, 100 nM).	192
Figure 8.6	Concentration of NO^* generated by the biotransformation of 5-hydroxytryptamine by CYP2B6, CYP2C9 and CYP2C19 in presence of catalase, as a function of hydroxylamine concentration produced by CYP2B6, CYP2C9 and CYP2C19 in absence of catalase.	193

Figure 9.1	Mécanismes potentiels pouvant mener à la diminution de l'activité du cytochrome P450	205
Figure 9.2	Autorégulation du <i>CYP1A1</i>	208
Figure 9.3	Voies de signalisation activées par les cytokines qui potentiellement vont moduler l'expression des CYP1A1 et CYP1A2.....	213
Figure 9.4	Voies de signalisation potentiellement impliquées dans l'induction du CYP3A6 par l'hypoxie <i>in vivo</i>	219
Figure 9.5	Voies de signalisation potentiellement impliquées dans l'induction du CYP3A6 par le S _{HYP} O	222
Figure 9.6	Biosynthèse et biotransformation de la sérotonine (5-HT)	230
Figure 9.7	Formation de NO [•] suite à la biotransformation de la sérotonine par les CYP2C9, CYP2C19 et CYP2B6.....	234

Liste des abréviations

1,3DMU :	1,3-dimethyluric acid
13-HETE :	13-hydroxyeicosatrienoic acid
1MU :	1-methyluric acid
3MX :	3-methylxanthine
AA :	acide arachidonique
AhR :	aryl hydrocarbon receptor
AP-1 :	activator protein-1
Arnt :	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
CAR :	constitutively activated receptor
COUP-TF :	chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor
DFB :	3,4-difluorobenzyloxy-5,5dimethyl-4-(4-methylsulfonylphenyl)-(5H)- furan-2-one
DFH :	3-hydroxy-4-(4-methylsulfonylphenyl)-(5H)-furan-2-one
EPO :	érythropoïétine
ERK :	extracellular-regulated kinase
FiO ₂ :	fractional concentration of inspired O ₂
GR :	glucocorticoid receptor
GSH :	glutathion réduit
H ₂ O ₂ :	peroxyde d'hydrogène
H _{CONT} :	hépatocytes provenant de lapins témoins
H _{HYP} :	hépatocytes provenant de lapins présentant de l'hypoxie
HIF-1 :	hypoxia-inducible factor 1

HNF-4 :	hepatocyte nuclear factor 4
HSP :	heat shock protein
IFN- γ :	interféron- γ
IL-1 β :	interleukine 1 β
JAK :	janus tyrosine kinase
JNK :	c-Jun N-terminal kinase
L-NAME :	N-nitro-L-arginine methyl ester
LPS :	lipopolysaccharides
MAPK :	mitogen-activated protein kinase
MEK :	mitogen-activated protein kinase kinase
M _r :	poids moléculaire relatif
NF- κ B :	facteur nucléaire-kappa B
NO $^{\bullet}$:	monoxyde d'azote
NOS :	NO $^{\bullet}$ synthase
NPS :	nitroprussiate de sodium
$^{\bullet}$ O ₂ $^{-}$:	anion superoxyde
OH $^{\bullet}$:	radical hydroxyle
P450 :	cytochrome P450
PI3-K :	phosphatidylinositol 3-kinase
PKA :	protéine kinase A
PKC :	protéine kinase C
PPAR :	peroxysome-proliférateur-activated receptor
PTK :	protéine tyrosine kinase
PXR :	pregnane X receptor

RH :	substrat
RXR :	retinoid X receptor
S _{CONT} :	sérum provenant de lapins témoins
S _{HYP} O :	sérum provenant de lapins présentant de l'hypoxie
SOR :	substances oxygénées réactives
STAT :	signal transduction and activation of transcription
TBARS :	substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique
TCDD :	tétrachlorodibenzo-p-dioxine
TNF- α :	tumour necrosis factor α
USF-1 :	upstream stimulatory factor-1
VEGF :	vascular endothelial growth factor
XREM :	xenobiotic-responsive enhancer module.

Remerciements

Mes premiers mots ne peuvent qu'aller à la personne qui m'a accordé sa confiance, son aide, celui qui a su m'insuffler son enthousiasme, sa curiosité et son engouement scientifique, mon directeur de recherche (et père adoptif), le Dr Patrick du Souich. L'enseignement et les conseils prodigués ont été très précieux tout au long de ces quatre années et le resteront à tout jamais. Cette thèse n'aurait pas été la même sans votre grande latitude, votre patience et vos encouragements. Vous m'avez appris beaucoup non seulement au point de vue professionnel, mais aussi au point de vue personnel. Je veux donc remercier le patron, mais aussi le second père que vous avez été pour moi.

Un merci tout spécial à Lucie Héroux (Lulu), la technicienne de laboratoire, mais surtout une amie. Merci pour le support technique (chirurgie), les avis et conseils qui ont été inestimables. Je vais m'ennuyer de nos nombreuses conversations, de nos fou rire et de tes conseils quotidiens. Merci pour tout!

Merci aux étudiants de mon laboratoire, aux collaborateurs ainsi qu'aux professeurs et personnel du département de pharmacologie pour leurs conseils éclairés et pour la résolution de problèmes quotidiens. Merci à Anne-Marie Bleau, pour les Nothern blot, mais surtout pour ton amitié et pour les nombreux fou rire encore indescriptibles.

Je tiens aussi à exprimer ici toute ma gratitude envers les membres du jury de cette thèse.

Merci à ma famille, tout spécialement à mes parents, pour le soutien moral, ainsi que pour les encouragements et la générosité inestimables. Merci pour les valeurs inculquées et pour m'avoir épaulé tout en me laissant à la fois libre dans mes choix de vie et de carrière. Je dédie cette thèse à ma mère qui a toujours été là pour moi tant dans les moments les plus durs que dans les beaux moments. Merci pour m'avoir enseigné à toujours persévérer, cette thèse est un exemple de la vertu que tu m'as enseignée. Je dédie aussi cette thèse à mon père qui m'a enseigné que la rigueur et l'assiduité portent toujours fruit dans la vie. Ton soutien précieux et tes innombrables conseils ont joué un rôle important tout au long de mon cheminement.

Merci à Patou pour avoir corrigé cette thèse, sans même la comprendre, pour les références, mais surtout pour m'avoir « endurée », encouragée et aimée dans mes hauts et mes bas. Bien que je demeure la principale artisane de cette thèse, je ne peux pas ignorer que la réalisation de celle-ci n'aurait jamais été possible sans ton amour et ton support. Je n'ai rien à ajouter, puisque tu as tout vécu auprès de moi. Je te dédie cette thèse et merci encore pour tout...

Merci à Mélanie et Louis-Philippe pour leurs conseils et encouragements. Merci à la gang du département de pharmacologie Claudia, Caroline, Annie, Stéphanie, Julie, Simon et Hugo pour les échanges fructueux en recherche, mais surtout pour les soirées mémorables! Merci, encore une fois, à Caroline et Annie pour les nombreuses discussions de cadres de porte et de corridors. Finalement, un merci tout spécial à Claudia qui m'a encouragée et motivée dans les moments de déprime et sans qui, l'organisation des nombreux partys n'aurait été la même.

Je sais que j'oublie des gens, mais un fait est certain, la thèse constitue une expérience intense, passionnante et marquante, et sans vous tous elle n'aurait pas été aussi agréable, vivante, et excitante.

Finalement, je tiens à souligner le support financier du Fonds de la recherche en santé du Québec ainsi que de la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal.

PREMIÈRE PARTIE

REVUE DE LA LITTÉRATURE

Introduction

Environ 3 300 000 patients au Canada souffrent de maladies respiratoires et il est connu que chez ces patients, la clairance de certains médicaments peut être modifiée ce qui peut être la cause d'apparition d'effets indésirables (Piafsky et coll., 1997; Statistiques Canada, 2001-2002). Par ailleurs, les pathologies se présentant avec de l'hypoxie s'observent chez environ 7 % des sujets âgés de 65 ans et ces patients prennent habituellement plusieurs médicaments par jour, ce qui fait que les interactions médicamenteuses au niveau de leur biotransformation par les cytochromes P450 sont fréquentes. Plus précisément, ces interactions médicamenteuses sont la cause de 5 à 10 % des hospitalisations et contribuent à augmenter la durée de l'hospitalisation (Statistiques Canada, 2001-2002). Ces chiffres permettent d'émettre l'hypothèse qu'une modification de la biotransformation des médicaments par l'hypoxie pourrait entraîner des répercussions importantes.

Peu d'études ont été entreprises pour comprendre comment les maladies respiratoires affectent la biotransformation des médicaments. Il y a une trentaine d'années, il a été observé chez des patients atteints de pathologies présentant de l'hypoxie, comme la maladie pulmonaire obstructive chronique, l'œdème pulmonaire ou encore l'insuffisance cardiaque congestive, que le métabolisme de la théophylline était réduit de 30 à 60 % (Piafsky et coll. 1977 ; du Souich et coll., 1978 ; Kuntz et coll., 1983). Hendeles et coll. (1977) ont rapporté pour la toute première fois que l'hypoxie modifie le métabolisme des médicaments. Des études dans notre laboratoire ont démontré que l'hypoxie, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, inactive et réprime certaines

cytochromes P450 tout en augmentant l'expression du CYP3A6 (Kurdi et coll. 1999; Fradette et coll., 2002; 2003). L'effet de l'hypoxie sur la régulation de l'expression et de l'activité des enzymes du cytochrome P450 est encore très mal compris. La compréhension des mécanismes sous-jacents aux changements du cytochrome P450 par l'hypoxie est essentielle afin d'optimiser l'utilisation des médicaments chez des patients présentant de l'hypoxie, ce qui aura comme effet de réduire l'incidence des effets indésirables, d'améliorer leur qualité de vie et de diminuer les coûts.

Lors de sa découverte, la seule fonction associée au cytochrome P450 était le métabolisme de xénobiotiques (Beaune, 1993). L'importance des membres de la superfamille des cytochromes P450 commence à émerger et surpasse de beaucoup son rôle dans le métabolisme des médicaments. Cela fait moins de vingt ans que nous savons que le cytochrome P450 est étroitement impliqué dans la production d'hormones, de vitamines, de cholestérol, de dérivés de l'acide arachidonique vasoactifs, etc. De plus, le cytochrome P450 semble aussi impliqué dans le développement de certaines pathologies, tels le cancer ou encore certains désordres neurologiques (Roman, 2002). La découverte du rôle endogène du cytochrome P450 a créé une nouvelle avenue de recherche qui progresse rapidement et qui contribue grandement à l'essor de la pharmacologie.

Cette thèse a pour but d'étudier les mécanismes sous-jacents aux changements de l'expression et de l'activité du cytochrome P450 produits par l'hypoxie. De plus, nous nous sommes intéressés au rôle que le cytochrome P450 a dans la production de substances vasoactives à partir de substrats endogènes. Afin de comprendre les

hypothèses de cette thèse, nous allons discuter dans la revue de la littérature de l'hypoxie, du cytochrome P450 et de sa régulation, de l'effet de l'hypoxie sur le cytochrome P450 et finalement, du rôle physiologique du cytochrome P450.

CHAPITRE 1

L'HYPOXIE

1. L'HYPOXIE

1.1 Définition

L'humain, comme la plupart des espèces animales, présente une dépendance totale à l'oxygène pour sa survie. Sans un apport adéquat en oxygène, l'organisme est donc condamné à mourir extrêmement rapidement. Durant l'embryogénèse, les organismes supérieurs développent des systèmes respiratoire et circulatoire complexes pour assurer la disponibilité de l'oxygène à toutes les cellules de l'organisme (Schumaker, 2002). L'hypoxie représente un état de déficience en oxygène tissulaire. Cette pathologie résulte d'une diminution de l'apport en oxygène au niveau du sang, d'une réduction de la capacité de transport de l'oxygène par le sang, ou encore d'une réduction de la circulation sanguine. Tout tissu corporel ayant besoin d'oxygène pour vivre, l'hypoxie entraîne le dépérissement irrémédiable de ceux-ci. Cela peut toucher non seulement les tissus superficiels comme la peau, mais aussi des tissus profonds comme les muscles ou autres organes (Lemasters et coll., 1981). L'hypoxie se manifeste cliniquement chez des patients présentant une condition pathologique tels que la maladie pulmonaire obstructive chronique, l'oedème pulmonaire aigu, l'insuffisance cardiaque congestive ou encore l'anémie. L'hypoxie tissulaire est aussi favorisée par des vaisseaux sanguins dont la perméabilité est diminuée, notamment à cause de l'athérosclérose, du diabète, de l'hypertension, du tabagisme ou simplement du vieillissement (Hendeles et coll., 1977; du Souich et coll., 1978; Kuntz et coll., 1983; Mieyal et coll., 2000).

Par le mouvement thoracique de l'inspiration, l'air atmosphérique arrive jusqu'à l'alvéole pulmonaire. L'enrichissement du sang en oxygène se fait donc au niveau de la paroi alvéolaire. L'oxygène est alors transporté aux cellules de l'organisme en se fixant sur l'hémoglobine des globules rouges (Schumaker, 2002). L'organisme puise l'oxygène dont il a besoin dans l'atmosphère à la pression barométrique environnante. Les proportions respectives des gaz atmosphériques sont 78% d'azote, 21% d'oxygène et 1% en CO₂, vapeur d'eau et autres gaz rares, ce qui constitue une pression de 160 mmHg. Cette pression d'oxygène inspiré permet de maintenir au niveau hépatique une pression moyenne en oxygène de 22 mmHg (de Groot et coll., 1988). Toutefois, pour ce qui est des hépatocytes, ils sont exposés à diverses concentrations en oxygène selon leur localisation dans le foie (Jungermann et Katz, 1982). Ainsi, lors d'une réduction de l'apport en oxygène, le degré d'hypoxie de la région centrilobulaire du foie est plus marqué que celui observé dans la région périportale (Lemasters et coll., 1981).

Une diminution de l'apport d'oxygène, l'hypoxie, entraînera une réponse physiologique générale de l'organisme pour compenser ce manque (Semenza, 2000). Ainsi, chez l'animal, une réponse rapide a lieu suite à la détection de la baisse du taux d'oxygène sanguin par les structures spécialisées situées dans la crosse aortique (les chimiorécepteurs). Un signal dopaminergique est alors envoyé au cerveau qui émet à son tour des signaux augmentant la respiration et le rythme cardiaque, ce qui résulte en une augmentation de la pression sanguine et de la saturation en oxygène nécessaire au métabolisme tissulaire. Dans le cas d'une période prolongée d'hypoxie, des modifications telles qu'une augmentation du métabolisme anaérobie et du nombre de

globules rouges sanguins permettent de compenser le manque d'oxygène de même que la production d'une énergie suffisante aux fonctions cellulaires (Schumacker, 2002).

Ces réponses de l'organisme sont bien connues sur le plan physiologique, mais aussi sur le plan moléculaire grâce aux nombreuses études réalisées principalement au cours des deux dernières décennies. La réponse cellulaire au stress qu'est l'hypoxie est régulée par la modification de l'expression de plusieurs protéines dites messagers, c'est-à-dire les facteurs de transcription, les cytokines, les substances oxygénées réactives, etc (Salceda et coll., 1997). Dans les sections qui vont suivre, nous allons discuter de ces messagers, essentiels à l'adaptation de l'organisme à l'hypoxie, potentiellement aussi impliqués dans la régulation du cytochrome P450.

1.2 HIF-1 : régulateur central de l'hypoxie

L'hypoxie est capable de stimuler l'expression de l'érythropoïétine (EPO), une hormone glycoprotéique. Cette hormone est acheminée par voie sanguine jusqu'à la moelle osseuse pour y stimuler les précurseurs des globules rouges qui vont proliférer et se différencier en érythrocytes, augmentant le nombre de globules rouges sanguins et donc le potentiel de transport de l'oxygène du sang. L'étude du promoteur de l'EPO a permis de mettre en évidence une séquence qui est sensible à l'hypoxie nommée HRE (hypoxia response element) (Semenza, 2000; Hur et coll., 2001). Cette séquence fixe en présence d'hypoxie un complexe protéique nommé HIF-1 (hypoxia inducible factor-1). Le HIF-1 est un hétérodimère constitué des deux sous-unités HIF-1 α et HIF-1 β . La sous-unité HIF-1 β a été identifiée comme étant le facteur Arnt (aryl hydrocarbon

receptor nuclear translocator), une protéine déjà décrite et impliquée dans les phénomènes de détoxification lors de la transcription des *CYP1A*. En revanche, le HIF-1 α est spécifique de la réponse hypoxique (Semenza, 2000).

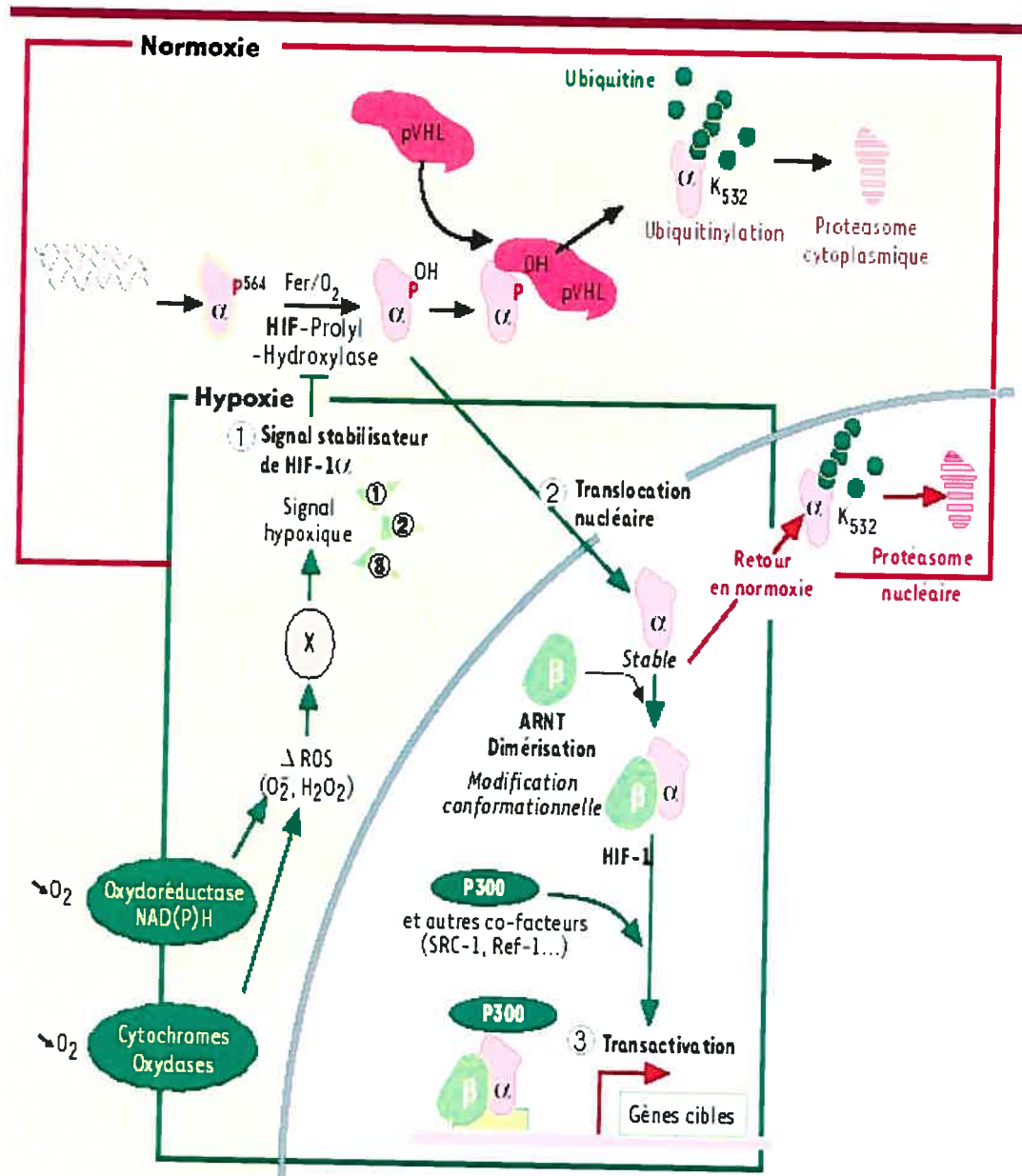
En ce qui concerne le HIF-1, les éléments clés de sa régulation et de son activité sont désormais bien connus. Ainsi, les ARNm des deux sous-unités de HIF-1 sont exprimés de façon constitutive et stable dans la plupart des cellules. Au niveau protéique, le HIF-1 β /Arnt est lui aussi stable. Toutefois, le HIF-1 α est dégradé extrêmement rapidement lors de normoxie (demi-vie de l'ordre de 5 min) par le système ubiquitine/protéasome. L'hypoxie entraîne la stabilisation de la sous-unité HIF-1 α en diminuant son ubiquitinylation, ce qui permet son accumulation et l'activation de la voie du HIF-1 (Salceda *et al.*, 1997). Une fois stabilisé, le HIF-1 α se déplace au noyau. Le HIF-1 α peut alors se dimériser dans ce compartiment avec le HIF-1 β /Arnt qui est pour sa part exclusivement nucléaire. L'hétérodimère se fixe alors aux éléments HRE des gènes sensibles à l'hypoxie et induit la transactivation de ces derniers. La figure 1.1 résume très bien les différents co-facteurs qui peuvent intervenir en se fixant au complexe HIF-1 α /Arnt et en augmentant la transactivation des gènes cibles (Gothié et Pouyssegur, 2002).

Figure 1.1

Activation de HIF-1

Régulation de l'activité de HIF-1. En condition de normoxie, la protéine HIF-1 α est très instable. Elle fixe pVHL, après une hydroxylation sur sa proline 564 dépendante de l'oxygène et du fer. La protéine pVHL fait partie d'un complexe qui possède une activité ubiquitine ligase. HIF-1 α est donc ubiquitinylé en normoxie puis dégradé par le protéosome. En condition d'hypoxie, HIF-1 α n'est plus hydroxylé et ne fixe plus pVHL. Le signal hypoxique va aussi déclencher la translocation nucléaire de HIF-1 α . Il peut dès lors se fixer à son partenaire HIF-1 β /ARNT1 ainsi qu'à d'autres co-facteurs tels que p300/CBP pour activer des gènes sous la dépendance d'éléments de réponse à l'hypoxie (HRE). Enfin, l'hypoxie permet d'augmenter directement la capacité transcriptionnelle de HIF-1 via ses domaines transactivateurs. Il est possible que d'autres senseurs (oxydoréductases, cytochromes) participent aussi à l'élaboration du signal hypoxique via les ROS (Gothié et Pouyssegur, 2002).

Figure 1.1
Activation de HIF-1



Bien que l'hypoxie soit le stimulus le plus important pour l'induction de HIF-1 α au niveau des cellules, d'autres stimulus, tels que l'insuline, l'IGF-1 et 2 (insulin-like growth factor), l'EGF (epidermal growth factor) et bien d'autres facteurs sont capables d'augmenter son niveau. En effet, il a été décrit qu'il existe une voie, indépendante de l'hypoxie, qui est capable d'induire la formation du complexe HIF-1 fonctionnel et ce par un mécanisme dépendant également de la stabilisation de HIF-1 α (Wenger, 2002). Ces notions seront reprises dans la discussion.

Décrit au départ comme le régulateur de l'expression du gène de l'érythropoïétine en présence d'hypoxie, le HIF-1 s'est révélé être en réalité le régulateur central de l'expression de nombreux gènes (Wang et coll., 1995). Le HIF-1 est exprimé dans tous les types cellulaires examinés à ce jour dont la plupart n'expriment pas d'érythropoïétine. Cela a été confirmé par l'analyse des régions promotrices de gènes sensibles à l'hypoxie, notamment les enzymes de la voie glycolytique, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), l'oxyde nitrique synthase inductible (NOS2), la tyrosine hydroxylase (TH) et la transferrine. L'ensemble de ces gènes permet au niveau cellulaire, mais aussi à l'échelle de l'organisme, une réponse adaptative à l'hypoxie et le HIF-1 semble être la clé de l'ensemble de ces réponses physiologiques (Bianchi et coll., 1999; Semenza, 2002). Le tableau 1.1 présente les gènes actuellement connus pour être régulés par HIF-1.

Tableau 1.1
Gènes régulés au niveau transcriptionnel par HIF-1

Métabolisme du glucose	Adénylate kinase 3 Aldolase A Aldolase C Énolase 1 Glucose transporteur 1 et 3 Glycéraldéhyde-3-phosphatase déshydrogénase Hexokinase 1 et 2 Lactate déshydrogénase A NIP3 Phosphofructokinase L Phosphoglycérate kinase 1 Pyruvate kinase M Triosephosphate isomérase
Prolifération cellulaire / viabilité	Insulin-like growth factor 2 IGF binding protein 1, 2 et 3 P21 Transforming growth factor β 3
Métabolisme du fer et érythropoïèse	Céruléoplasmine Érythropoïétine Transferrine Récepteur de la transferrine
Développement vasculaire / remodelage et tonus vasomoteur	Récepteur α_{18} -adrénergique Adrénomédulline Endothéline-1 Hème oxygénase-1 Oxyde nitrique synthase 2 Plasminogen activator inhibitor 1 Vascular endothelial growth factor (VEGF) Récepteur du VEGF R1 (FLT1)
Autres	Anhydrase carbonique 9 P35srj Prolyl-4-hydroxylase α (I)

Adapté de (Bianchi et coll., 1999; Semenza, 2002).

La démonstration de l'importance de HIF-1 dans l'homéostasie de l'oxygène a été clairement établie par l'invalidation des gènes (knock-out) codant pour les deux sous-unités du complexe. Le knock-out de Arnt/HIF-1 β a permis de démontrer l'importance du complexe HIF-1. En effet, l'invalidation du gène Arnt/HIF-1 β entraîne un retard du développement et des malformations au niveau du tube neural, de la vésicule vitelline et du placenta qui conduisent à la mort embryonnaire (Maltepe et coll., 1997). Pour ce qui est des knock-out de HIF-1 α , ils ont permis de démontrer le rôle global de HIF-1 α au niveau du développement et de la physiologie. En effet, les knock-out de HIF-1 α présentent une déficience au niveau de la vascularisation et des malformations cardiaques et neuronales très importante qui ont comme conséquence la mort embryonnaire (Lyer et coll., 1998).

L'adaptation des cellules cancéreuses à l'hypoxie est une étape critique pour la progression tumorale. Des tumeurs induites chez la souris par injection de cellules d'hépatome déficientes en Arnt/HIF-1 β sont significativement moins abondantes que celles induites par les cellules sauvages. En ce qui concerne le HIF-1 α , les tumeurs induites toujours chez la souris par l'injection de cellules déficientes en HIF-1 α sont faiblement vascularisées et moyennement hémorragiques, contrairement à celles issues de cellules HIF-1 $\alpha^{+/+}$. Le facteur de transcription HIF-1 joue donc aussi un rôle important dans le développement tumoral par son action angiogénique (Maxwell et coll., 1997).

1.3 Les médiateurs de l'hypoxie

En présence d'hypoxie, une réaction inflammatoire précoce est apparente (Ghezzi et coll., 1991). La dysfonction de l'endothélium vasculaire produite déclenche le phénomène d'adhésion leucocytaire et un afflux de macrophages à l'endothélium vasculaire. Les macrophages sont activés, de même que les cellules endothéliales, les astrocytes et bien d'autres types cellulaires qui libèrent diverses substances : des cytokines pro-inflammatoires du type des interleukines, le facteur de croissance tumorale, le facteur activateur des plaquettes, des substances oxygénées réactives ou encore du monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO^*). Ces médiateurs sont libérés dans le but d'orchestrer la défense de l'hôte (Naldini et coll., 1997).

1.3.1 Les cytokines

Pour s'adapter à son environnement, l'organisme utilise un certain nombre de médiateurs produits par une grande variété de types cellulaires afin d'évoluer et de défendre son intégrité. Ces médiateurs sont désignés sous le terme général de cytokines. Il s'agit de molécules polypeptidiques, glycosylées ou non, libérées plus ou moins spécifiquement par certaines cellules (Nansen et coll., 1997).

Les cytokines ont une action soit autocrine, c'est-à-dire qu'elles agissent sur la cellule sécrétrice elle-même, soit paracrine, c'est-à-dire qu'elles agissent sur les cellules voisines de celles qui les ont sécrétées, soit endocrine, c'est-à-dire qu'elles agissent à distance après avoir été véhiculées par le sang. Leur action autocrine et paracrine

prédomine sur leur effet endocrine qui s'observe surtout en cas d'hypersécrétion (Sporn et Roberts, 1985).

Les cytokines présentent des modes d'action relativement similaires : 1- l'activation de récepteurs membranaires, constitués de deux sous-unités, l'une servant à la fixation de la cytokine correspondante et l'autre à la transduction du signal; 2- l'intervention de plusieurs messagers intracellulaires; 3- une action nucléaire au niveau du génome, modifiant soit la replication de l'ADN, ou soit la transcription en ARN suivi de la traduction en protéines correspondantes responsables des effets (Malinin et coll., 1997; Di Donato et coll., 1997).

Chaque cytokine peut être produite par et agir sur différents types de cellules. Plusieurs cytokines peuvent avoir des fonctions assez semblables. L'effet induit par une cytokine est généralement dépendant d'une ou de plusieurs cytokines. Leurs effets sont interdépendants, pléiotropiques, c'est-à-dire physiologiques sur plusieurs cibles, et en cascade (Ghezzi et coll., 1991).

L'hypoxie provoque la libération de plusieurs cytokines telles que l'interleukine-1 (IL-1), le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, l'interféron- γ (IFN- γ), ainsi qu'une cytokine hematopoïétique, l'érythropoïétine (Lacombe et Mayeux, 1999). Parmi ces différentes cytokines, l'IL-1 joue un rôle majeur dans l'orchestration de l'hypoxie. Sous son action, de nombreuses cellules produisent des médiateurs lipidiques, des enzymes protéolytiques, des radicaux libres et des chémokines. Ces cytokines proviennent de différentes sources et ont de nombreux effets

(Naldini et coll., 1997; Benyo et coll., 1997; Krishnaswamy et coll., 1999; Lacombe et Mayeux, 1999). Le tableau 1.2 résume les fonctions des principales cytokines libérées par l'hypoxie.

Tableau 1.2
Les cytokines produites par l'organisme en présence d'hypoxie
et leurs fonctions

Cytokines	Fonctions
Interleukine-1β (IL-1β)	Régule la réponse inflammatoire via la différenciation des lymphocytes B et T, l'activation des cellules NK ("natural killers") et l'induction de l'expression des molécules d'adhésion. Active le facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B) et de ce fait induit l'expression de NOS2 (oxyde nitrique synthase 2 ou inductible).
Interleukine-2 (IL-2)	Stimule la prolifération et la différenciation des cellules immunocompétentes comme les cellules mononucléaires périphériques et induit aussi l'activation et la prolifération des cellules T.
Interféron-γ (IFN-γ)	Induit l'activation et la prolifération des cellules T, contrôle la prolifération de cellules tumorales et régule la réponse inflammatoire en activant les macrophages, en augmentant l'expression des CMH I et II (complexe majeur d'histocompatibilité I et II) et la synthèse de NO $^{\bullet}$ (oxyde nitrique).
Interleukine-6 (IL-6)	Impliquée dans le processus de guérison; stimule la prolifération et la différenciation des cellules immunocompétentes. Induit la syhtèse des protéines de la phase aigüe, et diminue la synthèse d'albumine et de certains cytochromes P450.

(Adapté de Naldini et coll. 1997)

1.3.2 Le facteur de transcription AP-1

La cascade des MAPK est une voie de signalisation intracellulaire qui est activée lors de l'hypoxie. Elle conduit à l'activation de nombreux facteurs de transcription (Semenza, 2000; Hur et coll., 2001). À ce jour, trois cascades de MAPK ont été décrites, celle des kinases régulées par des signaux extracellulaires (ERK), celle de la N-terminal kinase de c-jun appelée aussi protéine kinase activée par le stress (JNK) et enfin, celle de la kinase p38. La première cascade identifiée, celle des ERK, est fortement activée par des mitogènes et des facteurs de croissance. Elle conduit à l'activation de ERK1 et ERK2 (également appelées p42 et p44). Les deux autres cascades, JNK et MAPK p38, sont fortement activées par l'IL-1, le TNF- α ou le stress (Premkumar et coll., 2000). La liaison des cytokines à leurs récepteurs respectifs induit le recrutement de molécules adaptrices et conduit à la phosphorylation de c-jun, un des composants du facteur de transcription AP-1, ainsi qu'à l'augmentation de ses capacités d'activateur de transcription. Les facteurs de transcription de la famille de c-jun et c-fos s'assemblent en hétérodimère de façon à former le facteur de transcription activator protein 1 ou AP-1. Le facteur de transcription AP-1 est activé par de nombreux stimuli tels que le stress, les cytokines ou des agents mitogènes et il joue un rôle important dans l'hypoxie (Salnikow et coll., 2002; Premkumar et coll., 2000). En effet, tout comme HIF-1, ce facteur régule la transcription de nombreux gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie. Entre autres, il est connu que AP-1 et HIF-1 peuvent coopérer dans le but d'augmenter l'expression de gènes codant pour le VEGF ou encore la tyrosine hydroxylase (Salnikow *et al.*, 2002).

1.3.3 Les substances oxygénées réactives (SOR)

La consommation d'oxygène par le corps libère des sous-produits appelés substances oxygénées réactives (SOR). Les SOR sont en fait de petites molécules oxygénées possédant un électron libre. Parmi les SOR, l'on retrouve les formes radicalaires tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), l'hydroxyle ($\cdot OH$), le peroxyde (ROO^{\cdot}) et le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO^{\cdot}). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les peroxydes organiques ($ROOH$) et l'oxygène singulet (1O_2) représentent les principales formes radicalaires des SOR. Lorsqu'ils sont retrouvés en faibles quantités, ils jouent un rôle crucial pour la défense de l'organisme. Cependant, lorsque la production de SOR dépasse la capacité du corps à les neutraliser, l'effet net sur les tissus devient nuisible. Ainsi, les SOR peuvent dénaturer des protéines et des enzymes, dénaturer des acides nucléiques (ADN, ARN messager et de transfert) entraînant des perturbations de la transmission du message génétique et de la synthèse des protéines. De plus, les SOR peuvent aussi dégrader le collagène et l'élastine, favorisant l'apparition de troubles liés au vieillissement (fibroses et scléroses), ou encore agresser des lipides membranaires avec libération notamment d'acide arachidonique (Blokhina et coll., 2003).

Notons aussi que les SOR sont capables de modifier l'expression et l'activité des cytochromes P450 (Parent et coll., 1992; Proulx et du Souich, 1995a; Proulx et du Souich, 1995b). Nous connaissons actuellement plusieurs processus conduisant à la formation de SOR. Les SOR peuvent être générées au cours d'une dismutation, par l'intermédiaire des chaînes de transport d'électrons, par la participation des métaux de transitions et d'autres SOR, ou encore au niveau de certaines oxydases telles que la

xanthine oxydase, la NADPH oxydase, la cycloxygénase et la lipoxygénase (McCord, 2000).

Plusieurs auteurs ont proposé que l'hypoxie augmente la production de SOR dans les tissus (Brass et coll., 1991; Parent et coll., 1992; Proulx et du Souich, 1995a). Les cytokines seraient à la base de cette augmentation des SOR. En effet, au cours de l'hypoxie, les cytokines stimulent la production de SOR par les polynucléaires, les monocytes/macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Brass et coll., 1991; Park et coll., 1991). De plus, plusieurs études ont démontré que, lors de l'hypoxie, l'activité de la xanthine oxydase augmente ce qui induit la production de SOR (Parent et coll., 1992; Proulx et du Souich, 1995a; Proulx et du Souich, 1995b).

Une autre SOR à ne pas négliger à cause de son étroite relation avec le cytochrome P450 est le NO^\bullet . Comme nous le verrons en plus amples détails dans le chapitre 5 et dans la discussion, le NO^\bullet est surtout connu pour son puissant effet vasodilatateur. Cependant, dans une hémoprotéine, cette petite molécule peut aussi former un dérivé fer-nitrosyle qui est réversible et modifier l'activité d'enzymes clé du métabolisme telles la cyclooxygénase, la glutathion réductase et le cytochrome P450. Une inhibition irréversible du cytochrome P450 peut également se produire par le moyen d'une nitrotyrosilation. Finalement, le NO^\bullet peut aussi réagir avec l'anion superoxyde et former un anion très réactif, le peroxynitrite (ONOO^-), puis du nitrosyl (ONOOH) qui se décompose ensuite en radical hydroxyle toxique (Galea et Feinstein, 1999). La principale voie de biosynthèse connue à ce jour du NO^\bullet est via la NO synthase (NOS). La forme inductible de cette enzyme, la iNOS ou la NOS2, est exprimée

principalement dans les macrophages et dans les hépatocytes. Lors d'hypoxie, on assiste à la génération de NO^\bullet en réponse aux cytokines, telles que l'IL-1 et le TNF, ou encore suite à l'activation de HIF-1 (Ghezzi et coll., 1991; Gothié et Pouysségur, 2002). L'induction de la NOS et l'exposition au NO^\bullet diminue alors la synthèse des protéines hépatiques et inhibe des protéines mitochondriales (Taylor et coll., 1998).

Les défenses naturelles qui permettent de piéger les SOR sont réunies sous le nom de système antioxydant. Les éléments assurant le fonctionnement de ce système, normalement présents dans toutes les cellules, sont entre autres certaines vitamines, des oligoéléments, des substances végétales et plusieurs systèmes enzymatiques. En fait, les antioxydants peuvent être classifiés selon leur activités enzymatiques ou non enzymatiques (Halliwell et coll., 1995; McCord, 2000). La détoxification active suite à l'induction d'un stress oxydatif, comme par exemple l'hypoxie, se réalise par le biais d'enzymes telles la superoxyde dismutase et la catalase, ainsi que des enzymes à activité glutathion peroxydase, qui permettent la transformation de l'anion superoxyde et des peroxydes formés en excès en produits non toxiques. Cette ligne de défense comprend aussi des antioxydants non enzymatiques tels l'acide ascorbique, l'acide urique, la vitamine E, la vitamine C et les protéines chélatrices du fer (transferrine, hémossidérine) et du cuivre (albumine, céruloplasmine). Ces dernières préviennent la surproduction de radicaux libres de l'oxygène en inactivant les molécules endogènes (fer divalent, cuivre monovalent) ou exogènes (substances organiques de type quinone) susceptibles de générer les SOR (Halliwell et coll., 1995).

Chez le rat, l'hypoxie diminue l'activité de la glutathion peroxydase hépatique, ce qui résulte en l'augmentation de SOR. Ceci s'explique par le fait que la glutathion peroxydase permet l'élimination des peroxydes d'hydrogène et des peroxydes organiques présents dans le cytosol ou dans les mitochondries des cellules, en oxydant le glutathion (GSH) en disulfure (GSSG) (Parent et coll., 1992; Shan et coll., 1992). De plus, plusieurs chercheurs ont montré qu'au cours de l'hypoxie, l'activité de la superoxyde dismutase diminue, permettant ainsi l'augmentation des SOR. Dans les cellules de mammifères, la superoxyde dismutase catalyse l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène qui sera ensuite éliminé par la catalase ou la glutathion peroxydase (Shan et coll., 1992). Par conséquent, une augmentation de SOR dans les tissus pourrait être due non seulement à une surproduction, mais aussi à une réduction de la capacité des systèmes antioxydants à contrer les SOR.

CHAPITRE 2

LE CYTOCHROME P450

2. LE CYTOCHROME P450

2.1 Définition et historique

Une multitude de substances endogènes et exogènes subissent dans l'organisme un processus de métabolisation visant principalement à les rendre plus hydrosolubles et à favoriser ainsi leur élimination par des milieux hydriques comme l'urine et la bile. Deux réactions peuvent se succéder et se compléter. Tout d'abord, une réaction de phase I, dite de « fonctionnalisation », démasquant ou créant au niveau de la molécule un groupement polaire augmentant l'hydrophilie du principe actif. Deuxièmement, une réaction de phase II, dite de conjugaison, permettant de greffer sur un groupement polaire une molécule fortement hydrophile, comme par exemple l'acide glucuronique ou le glutathion. Parmi les réactions de phase I, les réactions d'oxydation sont très largement prépondérantes et sont principalement catalysées par les mono-oxygénases à cytochromes P450. Les cytochromes P450 (CYP) appartiennent à une superfamille d'hémoprotéines et sont donc constitués d'un atome de fer capable de lier l'oxygène (Beaune, 1993; Rendic et Di Carlo, 1997). Les systèmes à cytochromes P450 sont ubiquistes. On en trouve chez les procaryotes et les levures jusqu'aux plantes et aux mammifères, en passant par les champignons, les insectes, les mollusques, les poissons, les reptiles et les oiseaux (Rendic et Di Carlo, 1997). Au niveau cellulaire, les cytochromes P450 sont essentiellement localisés dans la membrane du réticulum endoplasmique et sont donc retrouvés dans les microsomes après fractionnement subcellulaire par ultracentrifugation. On les retrouve principalement au niveau des

hépatocytes, des cellules épithéliales des voies biliaires, des cellules épithéliales de l'intestin, au niveau du poumon, du rein, de la peau et des glandes surrénales (Beaune, 1993).

Le cytochrome P450 a été découvert au début des années 1950. Le laboratoire de Brodie a été l'un des premiers à étudier la biotransformation. C'est toutefois en 1955 que Axelrod et Brodie ont identifié un système enzymatique TPNH-dépendant (plus tard identifié comme NADPH-cytochrome P450 réductase) associé à la fraction microsomiale du foie. Ce système enzymatique avait comme caractéristique de participer aux réactions d'oxydation de plusieurs xénobiotiques (Axelrod, 1955; Brodie et coll., 1955).

En 1958, Garfinkel et Klingenberg ont signalé l'existence, chez le rat, d'un pigment dans le réticulum endoplasmique hépatique qui, complexé avec du monoxyde de carbone, après sa réduction en présence de NADPH, absorbait fortement la lumière dans le bleu à 450 nm, d'où le nom de cytochrome P450 ("P" pour pigment) (Garfinkel, 1958; Klingenberg, 1958). Cependant, ce n'est qu'en 1964 que Omura et Sato ont identifié la nature hémoprotéique du complexe, c'est-à-dire du cytochrome P450-CO (Omura et Sato, 1964). Ces découvertes sont à l'origine d'une technique spectrophotométrique de dosage permettant la mesure du contenu total de cytochrome P450, technique encore largement utilisée aujourd'hui.

L'isolement et la caractérisation du cytochrome P450 ont conduit par la suite à l'identification de multiples isoformes. C'est en 1968 que les groupes de Gunsalus et

Coon ont démontré que ce système à mono-oxygénases était composé de plusieurs protéines (Katagiri et coll., 1968; Lu et Coon, 1968). En 1982, les séquences primaires de deux isoformes ont été déterminées (Haniu et coll., 1982; Fujii-Kuriyama et coll., 1982). Puis finalement, ce n'est qu'en 1985 que la première structure tridimensionnelle du cytochrome P450 a été réalisée (Poulos et coll., 1985). Les cytochromes P450 proviennent d'un même gène ancestral s'étant différencié au cours de l'évolution phylogénique en de très nombreuses isoenzymes déterminés (Haniu et coll., 1982; Fujii-Kuriyama et coll., 1982).

À ce jour, plus de 500 gènes du cytochrome P450 ont été identifiés et caractérisés par séquençage. Ces gènes sont sous-divisés en 78 familles. Seulement 14 de ces familles sont toutefois exprimées chez les animaux et l'humain. Chaque famille regroupe des cytochromes ayant un pourcentage de similitude compris entre 40 et 65%. Cependant, chez l'humain, plus de 90% du métabolisme oxydatif des médicaments est assuré par seulement 6 cytochromes P450: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 et CYP3A4 (Roman, 2002). C'est en 1991 que la première classification des membres de la famille du cytochrome P450 a été créée. La nomenclature des cytochromes P450 tient compte de leur appartenance à des familles et sous-familles, parmi lesquels des isoformes ont été identifiées. Ainsi pour l'isoforme CYP3A4, qui est quantitativement le plus important au niveau hépatique et intestinal chez l'humain et qui participe au métabolisme oxydatif de plus de 50 % des médicaments que nous utilisons, CYP désigne le cytochrome P450, 3 la famille, A la sous-famille et 4 l'isoforme. Au moins 5 familles de P450 sont impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques: les familles 1, 2, 3, 5 et 6 (Beaune, 1993).

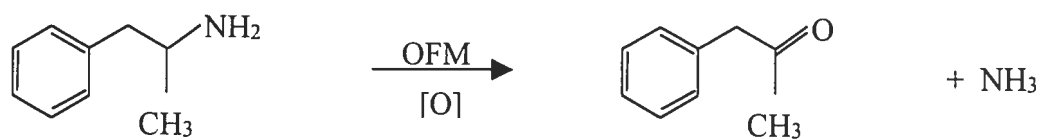
2.2 Mécanisme d'action du cytochrome P450

La majeure partie des réactions métaboliques (c'est-à-dire de la transformation biologique d'une substance par un ou des systèmes enzymatiques) a lieu dans le foie. La biotransformation représente l'ensemble des réactions biochimiques que subissent les substances endogènes et exogènes résultant en une diminution de leur lipophilicité et en une augmentation de leur polarité. Le but ultime du métabolisme est de faciliter l'excrétion de ces substances hors de l'organisme, ce qui est essentiel à sa survie (Nebert et Gonzalez 1987, Gonzalez et Nebert 1990, Peters et coll. 1991). Toutefois, il faut mentionner que le cytochrome P450 a aussi un rôle important dans la production et la biotransformation de multiples produits endogènes. Nous allons discuter de cet aspect dans le chapitre 5 de cette thèse.

La biotransformation des médicaments s'effectue généralement en deux temps. Les réactions de la phase I mettent en jeu l'oxydation, la réduction ou l'hydrolyse de la molécule mère, et produisent des métabolites de polarité croissante qui peuvent être excrétés ou transformés. Pour les métabolites qui subissent la phase II de la biotransformation, les groupes polaires présents sur l'intermédiaire se conjuguent avec le glutathion, l'acétate, le glucuronate, le sulfate ou la glycine pour produire des composés suffisamment polaires pour être excrétés dans la bile ou dans l'urine. La majeure partie du métabolisme de phase I fait appel au cytochrome P450. Tel que mentionné précédemment, le rôle principal des isoenzymes est de catalyser une réaction de monooxygénation afin de rendre les substrats plus hydrophiles en y introduisant un groupement polaire grâce à l'oxygène atmosphérique (e.g. oxydation aromatique ou

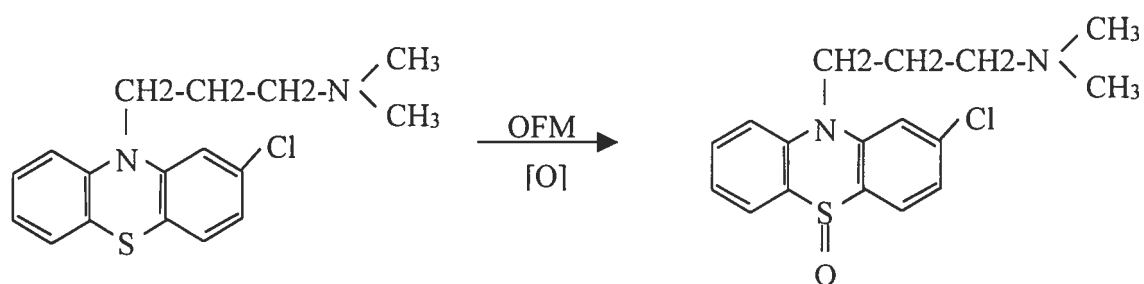
aliphatique) ou en dégageant une fonction pour augmenter la polarité (e.g. désacétylation, déhalogénéation) (Guengerich 1992a, 1992b, Beaune 1993).

Lors d'une réaction de biotransformation par le cytochrome P450, le mécanisme réactionnel implique une oxydation sans que celle-ci soit toujours apparente dans le produit final obtenu. Elle comporte des réactions d'hydroxylation (pouvant être aliphatique ou aromatique), de N-oxydation, de S-oxydation où l'oxydation est évidente car il y a addition d'un atome d'oxygène, et des réactions de N- et O-déalkylation, où la fixation d'un atome d'oxygène n'a été qu'une étape intermédiaire et n'apparaît pas dans le produit final. Les enzymes du cytochrome P450 catalysent aussi la déamination, la désulfatation, l'époxydation, la déhalogénéation ou la peroxydation (La Du, 1971; Riddick, 1998). La figure 2.1 illustre certaines de ces réactions oxydatives. Le cytochrome P450 peut générer plusieurs types de produits, mais les dérivés hydroxylés sont retrouvés en plus grande quantité. Notons que les cytochromes P450 ont peu de spécificité vis-à-vis leurs substrats par comparaison aux relations spécifiques entre un ligand et son récepteur. Ainsi, on constate que le même médicament peut être métabolisé par deux ou plusieurs iso-enzymes différentes (Riddick, 1998).

Désamination

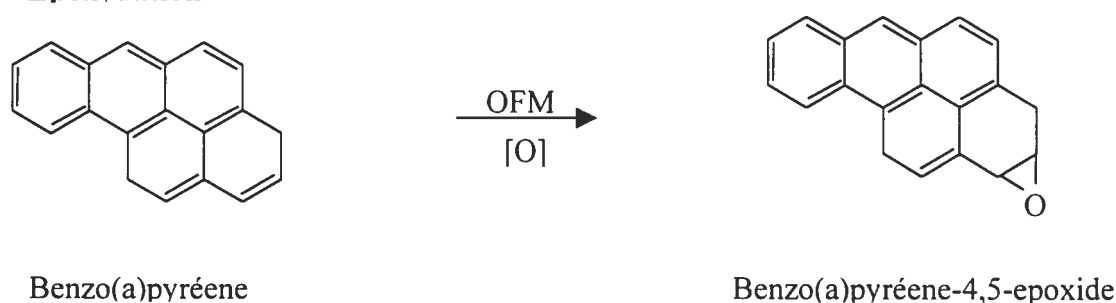
Amphétamine

Phénylacétone

Sulfoxydation

Chlorpromazine

Chlorpromazine sulfoxyde

Époxydation

Benzo(a)pyréne

Benzo(a)pyréne-4,5-epoxide

Un système à cytochrome P450 est en réalité un complexe multienzymatique formé de (Bernhardt, 1996):

- deux flavoprotéines, formant deux chaînes de transporteurs d'électrons : la NADPH cytochrome P450 réductase et la NADH cytochrome b5 réductase.
- deux hémoprotéines, le cytochrome b5 et le cytochrome P450. Ce dernier constitue une famille d'hémoprotéines de masse moléculaire comprise entre 43 et 60 kDa, possédant un noyau tétrapyrrolique qui complexe un atome de fer pouvant passer de l'état ferreux (Fe^{2+}) à l'état ferrique (Fe^{3+}) de manière réversible, ce qui confère des propriétés d'oxydo-réduction au cytochrome P450.

Le dénominateur commun de toutes les réactions auxquelles participent les enzymes du cytochrome P450 est l'insertion d'un atome d'oxygène sur un substrat par réduction d'une molécule d'oxygène. Le fonctionnement du cytochrome P-450 nécessite la présence d'une enzyme associée, appelée cytochrome P-450 réductase, qui prélève deux électrons à une flavoprotéine réduite pour les transférer au substrat qui sera oxydé. La flavoprotéine elle-même reçoit ses électrons du $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (Riddick, 1998). Le schéma de la figure 2.2 illustre la séquence catalytique (Fe représente l'atome de l'hème du site actif et RH le substrat):

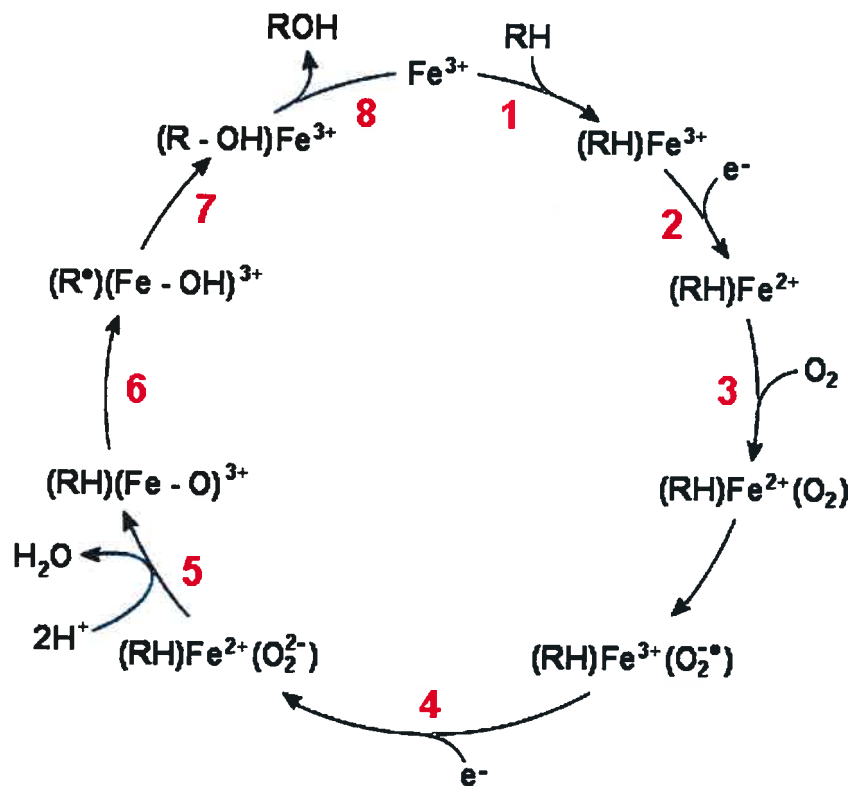
1. Tout d'abord, on assiste à la fixation du substrat sur le site catalytique. Cette liaison induit un changement de conformation du P450.
2. La seconde étape consiste en la réduction des deux flavines de la NADPH cytochrome P450 réductase par le NADPH et du transfert d'un électron au cytochrome P450; cet électron réduit le cytochrome P450 à sa forme ferreuse (Fe^{2+}).

3. Troisièmement, nous observons la fixation d'une molécule d'oxygène pour former un complexe cytochrome P450 dioxygéné ferreux; cette étape mène ensuite à un réarrangement conformationnel.
4. L'étape suivante inclut le transfert d'un second électron, nécessaire à l'activation de l'oxygène lié, par la NADPH cytochrome P450 réductase, ou le cytochrome b5 réductase, au complexe dioxygéné.
5. Lors de la cinquième étape, on assiste à la rupture de la liaison oxygène-oxygène avec incorporation d'un atome d'oxygène dans une molécule d'eau; le complexe fer-oxygène est quant à lui transformé en un intermédiaire radicalaire $(\text{Fe-O})^{3+}$.
6. L'hydrogène est enlevé du substrat pour former un hydroxyle.
7. L'hydroxyle est transféré au substrat.
8. Finalement, le substrat hydroxylé est dissocié et le cytochrome P450 est régénéré sous sa forme ferrique (Fe^{3+}).

Cette séquence catalytique est la raison pour laquelle le cytochrome P450 est appelé un système d'oxygénases à fonction mixte ou mono-oxygénases. Plus spécifiquement, cette appellation vient du fait qu'un des atomes d'oxygène est utilisé pour la formation d'une molécule d'eau, alors que l'autre permet la formation du métabolite hydroxylé (Bernhardt, 1996).

Figure 2.2

Réaction d'hydroxylation catalysée par le cytochrome P450



2.3 Les familles et sous-familles du cytochrome P450

La superfamille du cytochrome P450 d'enzymes est divisée en familles dont les membres ont un pourcentage d'homologie dans leur séquence protéique. Les différentes familles du cytochrome P450 peuvent être subdivisées en deux classes majeures, soit celles qui interviennent dans le métabolisme des xénobiotiques et celles qui interviennent dans la synthèse de substances endogènes. En réalité, on ignore le rôle endogène de la plupart des enzymes du cytochrome P450. Il existe au moins 14 familles

de cytochromes P450. Environ 90% de toutes les oxydations de médicaments sont catalysées par les isoformes CYP1A2, CYP2C8/9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4/5. Le CYP2A6 et le CYP2B6 jouent également un rôle important dans le métabolisme de certains médicaments (Beaune, 1993; Roman, 2002).

2.3.1 La famille du CYP1

L'activation métabolique de plusieurs toxines, médicaments et produits chimiques environnementaux, dont les hydrocarbures polycycliques aromatiques, se fait par l'intermédiaire des enzymes de la famille CYP1. Il existe deux sous-familles à la famille CYP1 : les CYP1A et CYP1B (Beaune, 1993).

La sous-famille CYP1A

La sous-famille CYP1A comprend deux membres retrouvés dans toutes les espèces (Beaune 1993, Park et coll. 1995). Chez l'humain, le CYP1A1 est exprimé dans de nombreux tissus extrahépatiques et aussi faiblement dans le foie. La fonction métabolique principale connue du CYP1A1 est l'hydroxylation des hydrocarbures polycycliques. Le CYP1A2 se retrouve presque exclusivement dans le foie. Cette isoforme représente de 10 à 15% de tous les cytochromes hépatiques humains (McKinnon et coll. 1991, Brosen 1995). De faibles niveaux ont aussi été détectés dans le cerveau, le duodénum et dans l'endothélium de la veine ombilicale. Le CYP1A2 intervient dans le métabolisme de médicaments comme la théophylline, la clozapine et la caféine. Les CYP1A1 et 1A2 sont aussi impliqués dans le métabolisme de substances endogènes tels l'acide arachidonique et l'oestradiol. Différents facteurs sont capables de moduler l'activité des enzymes de la sous-famille CYP1A. Ainsi, la sous-famille CYP1A est

induite par divers agents incluant ses propres substrats comme par exemple, les hydrocarbures polycycliques comme le 3-méthylcholanthrène (3-MC) (Daujat et coll. 1991) ou encore la dioxine (TCDD, 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine), un hydrocarbure aromatique, qui est le plus puissant inducteur de cette enzyme. Le CYP1A1 a été très étudié, car il produit des métabolites toxiques ou mutagènes à partir de xénobiotiques inertes (tel le benzo(a)pyrène). L'expression du CYP1A1 résulte d'une cascade d'événements qui commence par la pénétration du xénobiotique (par exemple la dioxine) liposoluble dans la membrane. Dans la partie interne de la membrane cellulaire, la dioxine se lie à un récepteur spécifique complexé à une protéine de choc thermique qui est relâchée dans l'opération. Le complexe dioxine-récepteur va rejoindre dans le noyau un récepteur nucléaire spécifique auquel il se lie, puis le dimère ainsi formé va se fixer sur une séquence du gène *CYP1A1* - l'élément de réponse aux xénobiotiques - d'où il va induire l'expression du gène (transcription) et la formation de la protéine CYP1A1 qui va métaboliser la dioxine. Plusieurs domaines dans le gène, principalement dans la région 5' flanquante, sont impliqués dans le contrôle de la transcription, dont un élément de réponse positive aux xénobiotique et un élément de réponse négative qui réprime la transcription du gène (Whitlock, 1999). Le gène *CYP1A2* contient un site de liaison pour AP-1 qui peut interagir avec l'élément de réponse au récepteur Ah (site XRE : xenobiotic responsive element) et ainsi réprimer la transcription (Abdel-Razzak, 1993).

La sous-famille CYP1B

Chez l'homme, le CYP1B1 est l'unique représentant de cette sous-famille et son expression est limitée au foie du fœtus (Shimada et coll. 1996). On possède peu

d'information au sujet des réactions métaboliques catalysées par cette sous-famille, cependant des études récentes démontrent que le CYP1B1 serait impliqué dans le métabolisme de l'oestradiol (Hutchison et coll., 1999).

2.3.2 La famille CYP2

La famille CYP2 représente la plus grande diversité de cytochromes P450 chez les espèces étudiées. Elle comprend en tout sept sous-familles chacune constituée d'un ou plusieurs membres (Gonzalez 1992, Guengerich 1992a, 1992b, Gonzalez et Lee 1996).

La sous-famille CYP2A

Cette sous-famille contient au moins 12 membres. Entre autres, les CYP2A10 et 2A11 sont retrouvés chez le lapin et les CYP2A6 et 2A7 chez l'humain. Bien que ces membres proviennent de la même famille, ils diffèrent sur plusieurs points. Notons par exemple les différences concernant leur activité catalytique ou la spécificité pour leurs substrats. Les CYP2A1 et 2A2 que l'on retrouve chez le rat sont reconnus pour leur capacité à hydroxyler des substances endogènes telles que la testostérone et la progestérone; tandis que chez l'humain, les seules réactions connues du CYP2A6 sont l'hydroxylation de la coumarine et de la cotinine (Honkakoski et coll. 1992, Yamazaki et coll. 1994, Nakajima et coll. 1996). Cette sous-famille est inductible par les barbituriques et par la dexaméthasone, résultant en une augmentation de deux à trois fois des niveaux d'expression de base (Wrighton et coll. 1993).

La sous-famille CYP2B

Selon les anciennes nomenclatures, la sous-famille CYP2B portait le nom du cytochrome inducible par le phénobarbital (Gonzalez 1992, Guengerich 1992a, 1992b). Encore une fois, cette famille est constituée de plusieurs membres. Les CYP2B1 et 2B2 ne sont pas retrouvés dans les tissus hépatiques et extrahépatiques humains (de Waziers et coll. 1990). Cependant chez le rat, ces deux sous-familles sont présentes dans une multitude de tissus, le duodénum et les poumons présentant des concentrations de 30% et de 50% supérieures à celles mesurées dans le foie (de Waziers et coll. 1990). La O-dé-éthylation de la pentoxyresorufin représente l'activité catalytique spécifique du CYP2B1 (Guengerich, 1991).

Il a été rapporté chez l'homme qu'une concentration élevée de CYP2A6 dans le foie s'accompagne aussi d'une haute concentration de CYP2B6. Cette observation permet de spéculer que l'expression des gènes du CYP2A6 et CYP2B6 est régie par les mêmes facteurs de régulation (Gonzalez et Lee 1996).

Les cytochromes de la sous-famille CYP2B sont les enzymes sur lesquelles l'activité inductrice du phénobarbital a été initialement observée. Les gènes des *CYP2B* contiennent une séquence dans la région 5' proximale permettant l'activation transcriptionnelle en présence de phénobarbital suite à la liaison de récepteurs nucléaires tels le CAR (constitutive androstane receptor), le PXR (pregnane X receptor) et le HNF-4 (facteur nucléaire de l'hépatocyte-4) (Trottier et coll., 1995; Stoltz et Anderson, 1999; Paquet et coll., 2000). Cette induction enzymatique est le reflet d'une activation transcriptionnelle conduisant rapidement à des concentrations de

protéines de 20 à 50 fois supérieures aux niveaux basaux (Kocarek et coll. 1990, Paolini et coll. 1991, Wortelboer et coll. 1991). La sous-famille CYP2B contribue au métabolisme de plusieurs xénobiotiques et est responsable de l'activation de toxines comme le bromobenzène ou le CCl_4 . La sous-famille CYP2B est aussi impliquée dans le métabolisme de substances endogènes puisqu'elle catalyse la biotransformation de l'acide arachidonique en acides époxyécosatriénoïques (EETs), métabolites ayant une fonction importante dans l'homéostasie cardiovasculaire (Roman, 2002).

La sous-famille CYP2C

Le CYP2C est la sous-famille la plus complexe. Présentement, 28 membres de la sous-famille CYP2C ont été répertoriés. Les enzymes de cette sous-famille possèdent plus de 80% d'homologie et ont des activités catalytiques semblables. Sur le plan quantitatif, le CYP2C est la deuxième sous-famille en importance. Le CYP2C représente près de 18% des cytochromes hépatiques totaux. Le métabolisme de nombreux composés endogènes (impliqués dans la formation des EETs et dans le métabolisme de l'oestradiol) et de nombreux médicaments est catalysé par le CYP2C (Roman, 2002). Il catalyse aussi l'activation de certains promédicaments et de quelques composés chimiques environnementaux. Le CYP2C9 est l'enzyme majeure de la sous-famille CYP2C. Ce dernier catalyse le métabolisme de nombreux médicaments comme les anti-inflammatoires non-stéroïdiens, les anti-diabétiques oraux, les anti-convulsivants, la S-warfarine et le losartan (Guengerich, 1991).

La sous-famille CYP2C est induite par la rifampicine et par le phénobarbital (Friedberg et coll. 1986). L'inhibition des CYP2C se fait par divers agents telles la

cimétidine, le sulfaphénazole pour les CYP2C8-10, ainsi que la fluoxétine, la fluvoxamine et la tranylcypromine pour les CYP2C17-19 (Sesardic et coll. 1990, Nemeroff et coll. 1996, Brösen et coll. 1993). Notons aussi que certaines isoformes de cette sous-famille, dont le CYP2C9 et le CYP2C19 possèdent un polymorphisme génétique (Ingelman-Sunberg et coll., 1999).

La sous-famille CYP2D

La sous-famille CYP2D comprend trois membres chez l'humain et cinq chez le rat. Toutefois, chez l'humain le seul membre actif est le CYP2D6. Cette isoforme intervient dans le métabolisme de nombreux médicaments. Plus de 80 médicaments sont des substrats du CYP2D6 dont les bêta-bloquants, les anti-dépresseurs tricycliques, les analgésiques et le dextrométorphan. Il intervient aussi dans le métabolisme de certaines substances endogènes, dont l'acide arachidonique, et de composés environnementaux procarcinogènes. Jusqu'à présent, aucun inducteur de cette enzyme n'a encore été découvert. Cependant, quelques agents pharmacologiques, comme la quinidine, sont de puissants inhibiteurs de l'activité catalytique du CYP2D6. Une variabilité interindividuelle importante caractérise l'activité de l'enzyme CYP2D6. Cette variabilité est expliquée par des différences génétiques affectant l'activité intrinsèque de plusieurs allèles. Le premier exemple de polymorphisme démontré pour cette enzyme fut celui de la débrisoquine. Plusieurs phénotypes ont ainsi été définis représentés par les métaboliseurs lents, les métaboliseurs rapides et les métaboliseurs ultrarapides (Ingelman-Sunberg et coll., 1999).

La sous-famille CYP2E

Chez l'homme, le rat et la souris, cette sous-famille ne contient présentement qu'une seule isoenzyme, le CYP2E1, tandis que le lapin en possède deux qui sont fortement similaires entre elles (Peng et coll. 1991). L'homologie du CYP2E1 entre les espèces est parmi celles qui sont le mieux conservées (Guengerich et coll. 1991). Le CYP2E1 se retrouve principalement dans le foie. On le retrouve aussi à de plus faibles niveaux dans l'intestin, les poumons et les leucocytes de diabétiques non-contrôlés (Song et coll. 1990, Jones, 1981, Villard et coll. 1994). Le CYP2E1 catalyse le métabolisme de plus de 100 substrats. Parmi ces molécules, certaines sont des substances endogènes (acétone, acide arachidonique), d'autres proviennent de l'alimentation (éthanol), d'autres sont des médicaments (anesthésiques) et d'autres sont des solvants organiques (benzène). Lors du métabolisme de l'éthanol, le CYP2E1 produit des radicaux libres, notamment des radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$) qui vont participer à l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde et à la formation de radicaux hydroxyéthyles impliqués dans la toxicité de l'éthanol (Ronis et coll., 1996).

À la suite de l'administration de nombreux produits organiques comme l'éthanol, le pyrazole, l'isoniazide, l'acétone, le benzène ou la pyridine, la concentration du CYP2E1 peut augmenter de 2 à 8 fois (Hansson et coll. 1990, Wortelboer et coll. 1991). Diverses conditions pathologiques tels le jeûne, le diabète et l'obésité provoquent également une induction de cette isoenzyme (Johansson et coll. 1988). L'inhibition de l'activité du CYP2E1 a lieu en présence du disulfiram et du 4-méthylpyrazole (Bertram et coll. 1982, Feierman et Cederbaum 1987, Brady et coll. 1991). Il existe aussi un polymorphisme génétique du CYP2E1 dans la population japonaise impliquant une

région du gène qui interagit avec le facteur de transcription (Touw, 1997; Ingelman-Sunberg et coll., 1999).

La sous-famille CYP2F

La sous-famille CYP2F n'est pas très bien connue. Cette sous-famille ne contient qu'un seul membre, le CYP2F1 presque exclusivement exprimé dans les poumons. La fonction catalytique du CYP2F1 n'est toutefois pas connue (Beaune, 1993).

La sous-famille CYP2J

La sous-famille CYP2J comprend 10 membres. Ces membres sont reconnus pour être impliqués dans la formation des EETs dans les organes extra-hépatiques (Roman, 2002).

2.3.3 La Famille du CYP3

Sur le plan quantitatif, la sous-famille CYP3A est la plus importante. En effet, les concentrations hépatiques du CYP3A représentent généralement de 25 à 28% des cytochromes P450 hépatiques totaux, mais chez certains individus cette proportion peut s'élever à 70%. Les isoformes du CYP3A sont présents dans la région centrilobulaire du foie (Palmer et coll. 1992). Les enzymes de la sous-famille CYP3A interviennent dans le métabolisme de nombreux médicaments et stéroïdes endogènes. Elles catalysent également l'activation de certains procarcinogènes pharmacologiques, environnementaux et nutritionnels. Chez l'humain, le CYP3A4 est l'isoforme le plus abondamment exprimé au niveau du foie et du tractus gastro-intestinal. Le CYP3A1

chez le rat et le CYP3A6 chez le lapin sont des homologues du CYP3A4. Cet isoforme contribue au métabolisme de près de 50% des médicaments utilisés en clinique. Par sa présence importante dans l'intestin grêle et le foie, le CYP3A4 joue un rôle important dans le métabolisme présystémique de nombreux médicaments. Plus de 150 médicaments sont des substrats de cette isoforme dont des anesthésiques, des immunosuppresseurs, des antiarythmiques, des antibiotiques, des benzodiazépines, des antihistaminiques, etc (Beaune, 1993). Plusieurs composés exogènes et endogènes peuvent inhiber l'activité du CYP3A4 tels l'érythromycine, le kétoconazole et le jus de pamplemousse. Par ailleurs, des agents pharmacologiques tels que la rifampicine et les barbituriques ont la capacité d'induire le CYP3A4. La présence d'une séquence dans la région 5' proximale du gène du *CYP3A4* permet la liaison de récepteurs nucléaires, activés par les inducteurs, et ainsi déclenche la transcription (Maurel, 1996). Notons la présence chez l'humain de deux autres membres de la sous-famille CYP3A : les CYP3A5 et CYP3A7. Le CYP3A7 est considéré comme une enzyme foetale, tandis que le CYP3A5 est l'isoforme prédominante dans l'estomac et les poumons. Des études font état d'une grande variabilité interindividuelle quant au contenu de CYP3A dans l'intestin grêle (Snawder et Lipscomb, 2000).

2.3.4 La Famille du CYP4

Six sous-familles ont été identifiées dans la famille CYP4. Les sous-familles CYP4A et CYP4F ont été les plus étudiées. La sous-famille CYP4A qui comprend 14 membres est exprimée dans le foie, les reins et le cerveau du rat. Pour ce qui est de la famille CYP4F, elle comprend 16 membres qui sont exprimés dans les reins. La famille du CYP4 est donc fortement impliquée dans le métabolisme de plusieurs substrats

endogènes dont les acides gras et les prostaglandines (Roman, 2002). Les isoformes des familles CYP4A, CYP4B et CYP4F catalysent l'hydroxylation des acides gras. Ces enzymes sont surtout connues pour leur métabolisme de l'acide arachidonique en acide hydroxyeicosatétranoïque (20-HETE) et en acides époxyeicosatriénoïques (EETs), métabolites ayant un rôle dans l'homéostasie cardiovasculaire très important. Ces isoformes sont induites par le chlofibrate et les proliférateurs du peroxysome via un récepteur spécifique PPAR ("peroxysome-proliferator-activated receptor") (Lin et Lu, 1998).

CHAPITRE 3

LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION ET DE L'ACTIVITÉ DES CYTOCHROMES P450

Facteurs de variation de l'expression et de l'activité du cytochrome P450.

L'expression et l'activité du cytochrome P450 sont très variables d'un individu à un autre et chez un même individu en fonction de facteurs tels que l'âge, la diète, le sexe ou encore les caractéristiques génétiques. De plus, de nombreux agents pharmacologiques peuvent affecter l'activité catalytique et l'expression des cytochromes P450 (Batt et coll., 1993; Bernhardt, 1996; Morgan, 1997; Ingelman-Sunberg et coll., 1999). Dans les pages qui suivent, nous allons discuter des causes qui expliquent les changements d'expression et d'activité du cytochrome P450. Spécifiquement, nous discuterons des facteurs associées à l'individu, la génétique, le sexe, l'âge et la diète, et des facteurs reliées à la régulation intracellulaire du cytochrome P450.

3.1 Les facteurs reliés à l'individu

Facteurs génétiques

L'activité de certains cytochromes P450 est fortement influencée par un polymorphisme génétique. La présence d'un polymorphisme influence la vitesse de biotransformation et par conséquent, l'efficacité et la toxicité du médicament. Le polymorphisme est en fait le résultat de mutations dans le gène menant à la formation d'allèles récessives qui sont moins actives ou tout simplement inactives. La détermination du génotype permet de différencier les métaboliseurs lents, les normaux et les rapides. Les répercussions cliniques de la présence d'un phénotype métaboliseur

lent sont similaires à celles d'un inhibiteur chimique. Par ailleurs, un phénotype métabolisateur rapide s'apparente à une induction chimique (Ingelman-Sunberg et coll., 1999).

En moyenne, 40% des réactions de biotransformation chez l'humain font appel à des isoformes polymorphiques. Des traits polymorphiques communs sont souvent trouvés dans les grandes ethnies, probablement dus au mode de vie et aux contraintes d'environnement auxquelles elles ont été longuement soumises dans le passé. Des individus porteurs d'un phénotype lent ou ultrarapide peuvent présenter des effets indésirables à un médicament qui est normalement toléré par les autres individus, ou peuvent métaboliser un médicament très vite et ainsi diminuer les bénéfices de son action (Ingelman-Sunberg et coll., 1999).

Les enzymes CYP2D6, CYP2C9 et CYP2C19 sont les plus fréquemment impliqués dans le métabolisme polymorphique de certains médicaments (Ingelman-Sunberg et coll., 1999). Tel que mentionné précédemment, l'exemple le plus couramment rapporté est celui de la variation du métabolisme de la débrisoquine attribué au polymorphisme de l'isoforme CYP2D6. Environ 5 à 10% de la population caucasienne et environ 1% de la population asiatique catalyse l'oxydation de la débrisoquine à une vitesse réduite par rapport aux autres membres de ces populations (Nakamura et coll., 1985).

Le sexe

Chez l'humain tout comme chez l'animal, il existe des variations au niveau du métabolisme de substances endogènes et exogènes reliées au sexe. Toutefois, il est important de noter que cette différence reliée au sexe est spécifique aux espèces. Par exemple, la biotransformation de l'antipyrine n'est pas affectée par le sexe chez l'humain tandis que chez le rat, elle est plus rapide chez le mâle que chez la femelle (Teunissen et coll., 1982). Chez l'humain, Hunt et coll. (1992) ont démontré que l'activité de la N-desméthylation de l'érythromycine catalysée par les CYP3A est de 24% supérieure chez la femme que chez l'homme et ce pour un groupe d'âge allant de 27 à 83 ans. Des différences dépendant du sexe ont été aussi observées dans le cas des benzodiazépines et des oestrogènes. Ces différences reliées au sexe seraient en fait associées à la sécrétion sexe-dépendante de différentes hormones. Il a en effet été démontré que plusieurs cytochromes P450 sont sous le contrôle de la sécrétion d'hormones. Par exemple, chez le rat, les jeunes mâles adultes métabolisent les médicaments plus rapidement que les femelles. Cette différence a été clairement associée aux androgènes et à l'expression sexe-spécifique de certaines cytochromes P450 tels les CYP2A2 et CYP3A2 (Shapiro et coll., 1995). Une différence sexe-dépendante existe aussi chez l'humain affectant le métabolisme de l'éthanol, du propranolol et des oestrogènes. Les stéroïdes sexuels contribueraient de manière directe à la différence observée entre les deux sexes, mais le déterminant hormonal majeur serait le profil sexe-dépendant de la sécrétion de l'hormone de croissance par l'hypophyse (Shapiro et coll., 1995).

L'âge

L'âge peut aussi être un facteur important dans le processus d'élimination d'une substance endogène ou exogène. En effet, la fonction hépatique ainsi que le cytochrome P450 varient avec l'âge. Par exemple, physiologiquement, les personnes âgées se distinguent par la baisse de la masse et du débit sanguin hépatique, par la diminution de la fonction rénale, mais surtout une diminution des enzymes de phase I comme les cytochromes P450 (Greenblatt et coll. 1982, Kamatake et coll. 1985, Durnas et coll. 1990, Hunt et coll. 1992). Il existe très peu de données concernant l'impact du vieillissement sur la fonction et l'activité enzymatique dans l'intestin et dans d'autres organes extrahépatiques. Les nouveau-nés et les enfants sont aussi un groupe d'individus auquel nous devons porter une attention particulière. En effet le CYP3A4, l'isoforme le plus abondant, et le CYP1A2 sont tous deux absents chez le fœtus et commencent à être exprimés à partir des premiers mois jusqu'à l'âge adulte. En somme, l'expression des cytochromes P450 est variable selon le stade du développement (Batt et coll., 1993).

La diète

Il s'avère difficile de dégager une généralisation quant aux effets de la diète, car chaque isoforme du cytochrome P450 montre une sensibilité particulière. Néanmoins, on reconnaît qu'une diète faible en éléments nutritifs comme les hydrates de carbone, des lipides ou des protéines peut affecter la biotransformation de substances endogènes ou exogènes. Par exemple, une diète pauvre en protéines peut résulter en une diminution de la vitesse de biotransformation de certaines substances tels le phénobarbital ou l'aniline. En plus d'entraîner une baisse de l'activité, la diète

hypoprotéique peut aussi provoquer une diminution de la quantité totale de cytochrome P450 (Kato et Takanaka, 1968). Plusieurs vitamines et minéraux peuvent également influencer la capacité métabolique. Il est intéressant de noter que les indoles, retrouvés dans certains légumes tel le brocoli, ont une certaine capacité d'induire la carcinogénèse en causant une forte augmentation de l'activité des cytochromes P450 et de la conjugaison. À l'inverse, le jus de pamplemousse exerce un effet inhibiteur sur le CYP3A4 au niveau de l'intestin et non au niveau du foie, ce qui a pour effet d'augmenter la biodisponibilité de substrat métabolisés par cette isoforme (Walter-Sack et Klotz, 1996).

3.2 La régulation intracellulaire de l'expression et de l'activité du cytochrome P450

Dans la cellule, de nombreux mécanismes interviennent dans la régulation des cytochromes P450. Les dernières années ont surtout été marquées par d'importants progrès des connaissances concernant les mécanismes de l'induction. L'induction des cytochromes P450 est un phénomène bien connu. Le mécanisme principal se base sur l'activation de la transcription. En effet, le degré d'activation de la transcription est suffisant pour expliquer l'augmentation de la quantité de protéines (Sheweita, 2000). Un second mécanisme de régulation se réalise par le biais du contrôle post-transcriptionnel au niveau de l'ARNm. Notons que la concentration en ARNm est en partie dépendante de sa demi-vie dans le cytoplasme, ainsi sa vitesse de dégradation peut jouer un rôle important dans l'expression inductible de certains gènes. Une stabilisation De l'ARN messenger pourrait donc expliquer l'augmentation de son expression (Morgan, 1997). Pour ce qui est de la protéine, une régulation

traductionnelle et la dégradation de cette dernière sont des mécanismes de contrôle de son expression (Batt et coll., 1993; Bernhardt, 1996; Morgan, 1997).

En revanche, les connaissances concernant la répression des cytochromes P450 ne sont pas aussi poussées. Il a été démontré que des mécanismes transcriptionnels, traductionnels, mais aussi post-traductionnels sont en cause (Bernhardt, 1996; Morgan, 1997). Ainsi, les agents agissant sur les mécanismes de régulation de l'expression des cytochromes P450 peuvent opérer au niveau de l'augmentation ou de la répression de la transcription du gène, de la stabilisation des messagers, de la traduction et de la stabilisation de l'enzyme. Par ailleurs, pour ce qui est de l'inactivation des cytochromes P450, la compétition réversible et irréversible des ligands, l'inhibition irréversible par des métabolites réactifs, ainsi que des mécanismes post-traductionnels sont impliqués (Bernhardt, 1996; Morgan, 1997).

Induction enzymatique

Il existe une grande variété d'inducteurs enzymatiques avec des structures chimiques très diverses. Les agents inducteurs sont répartis et définis en fonction de leur mode d'action. Les inducteurs pharmacologiques peuvent agir par le biais de deux mécanismes, c'est-à-dire par l'augmentation de la transcription du gène ou par la stabilisation de l'ARNm. La stabilisation de l'ARNm va permettre une augmentation de la synthèse de l'enzyme (Dogra et coll., 1998; Morgan, 2001).

Les facteurs de transcription sont des protéines essentielles à l'expression de gènes qui sont activés par des ligands ou un stress. Ils traduisent un signal intra ou

extracellulaire en une réponse cellulaire déclenchée par la transcription de gènes suite à leur liaison à des séquences spécifiques sur les promoteurs (Rahman, 2002). Ainsi, ces facteurs régulent la transcription des gènes dont ceux du cytochrome P450. Les facteurs susceptibles de réguler l'expression des cytochromes P450 comprennent les facteurs de transcription enrichis dans le foie (LEFT) tels les facteurs nucléaires de l'hépatocyte-1, 3 et 4, et le C/EBP (CAAT enhancer-binding protein). Parmi ces LEFT, le HNF-4 (facteur nucléaire de l'hépatocyte-4) constitue un élément important dans la régulation de plusieurs gènes hépatiques comme ceux impliqués dans le métabolisme des acides gras et du cholestérol. Le HNF-4 est aussi un facteur important pour l'expression constitutive des cytochromes CYP3A4, CYP3A5 et CYP2A5 chez l'humain (Jover et coll., 1998). Les facteurs de transcription comprennent également la superfamille des récepteurs nucléaires. Les récepteurs nucléaires, tels les CAR (constitutive androstane receptor), PXR (pregnane X receptor) ou encore PPAR (peroxysome-proliferator-activated receptor) régulent aussi l'expression des cytochromes P450 (Stoltz et Anderson, 1999; Paquet et coll., 2000; Zelko et Negishi, 2000).

Au cours des dernières décennies, les mécanismes d'action de certains inducteurs ont été élucidés. L'induction des CYP1A1 et CYP1A2 par les hydrocarbures polycycliques aromatiques, le 3-MC et le TCDD, est l'un des modèles les mieux connus. Le mécanisme débute par la liaison de ces ligands au récepteur cytosolique aryl hydrocarbon (AhR) complexé à une protéine de choc thermique qui est relâchée lors de la liaison. Le complexe, récepteur Ah et ligand, migre au noyau et se lie à un récepteur nucléaire spécifique, le Arnt (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). Puis, le complexe ainsi formé va se fixer sur une séquence du gène CYP1A1 - l'élément de

réponse aux xénobiotiques - d'où il va induire la transcription de l'ARNm de l'isoforme, suivi par l'augmentation de la traduction de la protéine. Dans cet exemple, le AhR lié au récepteur nucléaire Arnt est un facteur de transcription qui contrôle l'expression des CYP1A1 et CYP1A2 (Whitlock, 1999).

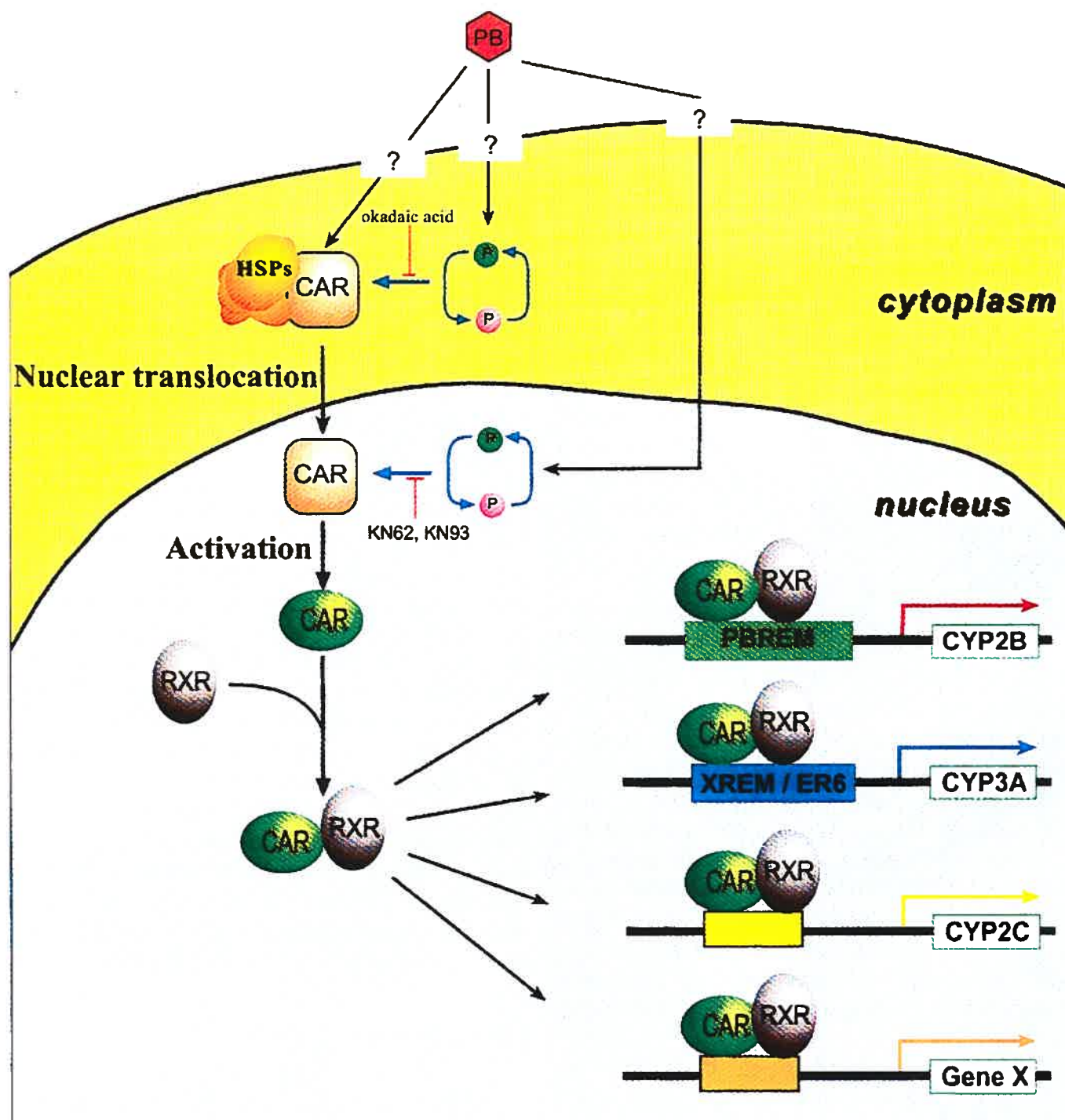
Contrairement à l'induction des membres de la sous-famille CYP1A, l'induction des membres des sous-familles CYP2B, CYP3A et CYP4A implique des récepteurs orphelins (i.e. des récepteurs dont les ligands physiologiques ne sont pas connus) qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires/récepteurs stéroïdiens (Honkakoski et Negishi, 2000). Des exemples des récepteurs orphelins sont entre autres le CAR, qui est impliqué dans l'induction des gènes *CYP2B* et *CYP3A*; le PXR, qui active la transcription des *CYP3A* en réponse à de nombreux inducteurs comme des stéroïdes; le HNF-4, qui produit une régulation positive des *CYP2B*; ou encore le PPAR, qui est impliqué dans l'induction des gènes de la famille *CYP4A*. Prenons par exemple les cytochromes de la sous-famille CYP2B. Ces derniers sont les enzymes sur lesquelles l'activité inductrice du phénobarbital a été initialement observée. Une séquence présente dans la région 5' proximale du gène du *CYP2B* permet l'activation transcriptionnelle du gène par le biais de la liaison de récepteurs nucléaires sous la forme d'hétérodimères avec, entre autres, le récepteur RXR (retinoid X receptor) (Trottier et coll., 1995; Stoltz et Anderson, 1999; Paquet et coll., 2000; Zelko et Negishi, 2000). Sous l'effet du phénobarbital, CAR subit une translocation dans le noyau ce qui engendre la formation du complexe hétérodimérique avec RXR (figure 3.1). Un mécanisme similaire explique l'induction du CYP3A en présence de dexaméthasone (Zelko et Negishi, 2000).

Figure 3.1

Mécanisme d'induction des cytochromes P450 par les récepteurs nucléaires

Induction des isoformes des familles CYP2B, CYP2C et CYP3A suite à l'activation de CAR (constitutive androstane receptor) par le phénobarbital. Sous l'effet du phénobarbital, CAR va se dissocier des HSPs (heat shock proteins) et va subir une translocation dans le noyau afin de former un dimère avec RXR (retinoid X receptor). L'hétérodimère CAR/PXR va ensuite induire la transcription de gènes suite à sa liaison dans la région 5' proximale des gènes (Zelko et Negishi, 2000).

Figure 3.1
Mécanisme d'induction des cytochromes P450 par les récepteurs nucléaires



Inhibition enzymatique

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer la régulation négative du cytochrome P450, à savoir : en diminuant la transcription des gènes, en réduisant la stabilité de leur ARNm, en limitant la traduction ou en stimulant la dégradation de certaines isoformes (Bernhardt, 1996; Morgan, 1997).

Il est tout d'abord important de noter que les facteurs de transcription peuvent se lier à des séquences de régulation positive et ainsi augmenter la transcription de gènes, mais ils peuvent aussi se lier à des séquences dites « silencer » et empêcher la transcription. De plus, la liaison de facteurs de transcription à certains sites sur le promoteur peut prévenir la formation du complexe d'initiation de la transcription et ainsi conduire à la réduction de l'expression des gènes. D'autres mécanismes menant à la diminution de la transcription incluent des changements de la fonction des récepteurs nucléaires. Ainsi, l'effet des récepteurs nucléaires peut être bloqué à plusieurs niveaux : lors de sa liaison au ligand ou à l'ADN, lors de la dimérisation et lors de la co-activation. La compétition entre les co-activateurs ou une interaction avec de co-répresseurs peut ainsi entraîner la diminution de la transcription des gènes (Abdel-Razzak et coll., 1993).

Les modifications post-traductionnelles du cytochrome P450 telles la glycosylation et la phosphorylation provoquent des changements au niveau du cytochrome P450. Ces modifications peuvent non seulement stimuler la dégradation des cytochromes P450, mais elles peuvent aussi agir au niveau de leur activité métabolique. La phosphorylation joue un rôle clé dans la régulation post-traductionnelle à court terme

des cytochromes P450 puisqu'elle est réversible. Les enzymes du cytochrome P450 peuvent être phosphorylées menant à une diminution de leur activité catalytique sans toutefois affecter la quantité de protéines; ce sujet sera traité en détail dans la discussion. Cependant, lorsque les CYP11A, 11B et 2B sont phosphorylés, l'hémoprotéine se dénature ce qui rend l'enzyme inactive de façon permanente. Le CYP3A1 peut également être phosphorylé suivi de la dénaturation de la protéine, perte de l'hème et de l'activité catalytique (Roman, 2002).

Les mécanismes d'inhibition enzymatique incluent aussi la compétition réversible et irréversible avec un autre ligand pour les sites de métabolisme. L'importance clinique de l'inhibition dépend de la nature du substrat, du nombre d'isoenzymes qui métabolisent le substrat, de la concentration de l'agent inhibant et du métabolisme de ce dernier (Barry et Feely 1990, Murray 1992). En clinique, l'inhibition du cytochrome P450 est fréquemment la cause d'interactions médicamenteuses. Par exemple, l'oméprazole inhibe le métabolisme du diazepam par sa liaison au CYP2C (Goldstein, 2001).

La biotransformation d'un substrat par le cytochrome P450 peut générer un métabolite réactif qui va se fixer à l'enzyme et ainsi produire une inhibition irréversible. Lorsque des composés éthyléniques, des cyclopropylamines ou encore des dihydropyridines sont transformés en intermédiaires radicalaires par les enzymes du cytochrome P450, ils les inactivent de façon autocatalytique et irréversible par une alkylation. Un exemple de ce type d'inhibition est le 2-bromo-4-nitroacétophénone qui possède une sélectivité pour le CYP1A1. Le cytochrome P450 peut aussi convertir

certaines substances telles que les dioxols, des hydrazines et des dérivés alkylamines en métabolites intermédiaires qui s'associent au cytochrome P450 pour former un complexe. La formation de ce complexe, qui est très long à se dissocier, inactive l'enzyme (Rendic et Di Carlo, 1997; Lin et Lu, 1998; Pelkonen et coll., 1998).

CHAPITRE 4

EFFET DE L'HYPOXIE SUR LE CYTOCHROME P450

3 L'EFFET DE L'HYPOXIE SUR LE CYTOCHROME P450

En 1974, Jacobs et Senior, ont proposé l'hypoxie comme mécanisme sous-jacent à l'apparition de la toxicité de la théophylline. Trois ans plus tard, en 1977, il a été rapporté pour la première fois que chez les patients souffrant d'une maladie pulmonaire chronique, l'hypoxie modifie la biotransformation de la théophylline, c'est-à-dire que l'hypoxie réduit sa clairance (Hendeles et coll., 1977). Par la suite, plusieurs autres conditions pathologiques se présentant avec de l'hypoxie tels le cor pulmonale, l'oedème pulmonaire aigu et l'insuffisance cardiaque congestive, ont aussi été associées à la diminution de la vitesse de biotransformation de la théophylline (Piafsky et coll. 1977; du Souich et coll., 1978; Kuntz et coll., 1983).

Plusieurs études *in vivo* ont démontré que l'hypoxie diminue la clairance de médicaments tels que la théophylline, la lidocaïne et la phénytoïne (Agnihotri et coll., 1978; du Souich et coll., 1978). Plus récemment, il a été démontré *in vivo* et *in vitro* que l'hypoxie réduit l'activité et la quantité de plusieurs protéines microsomiales hépatiques (du Souich et coll., 1990). Par ailleurs, les résultats de quelques études portant sur l'effet de l'hypoxie chez le rat ont montré que l'hypoxie augmente la quantité du cytochrome P450 total (Longmuir et Pashko, 1976; Ou et coll., 1980; Bonkovsky et coll., 1986). Cependant, ces contradictions apparentes n'ont pas été clairement expliquées.

4.1 Études chez l'animal

On retrouve peu d'études à ce jour portant sur l'effet de l'hypoxie sur le cytochrome P450. La première étude réalisée chez l'animal a été publiée en 1975 par Bechtel et coll. Ils ont observé, dans le foie de souris, un effet phasique de l'hypoxie chronique sur le cytochrome P450, démontrant d'abord une diminution au premier jour, ensuite une augmentation au deuxième et troisième jours, pour finalement rediminuer et demeurer à des niveaux très bas par la suite. Tel que mentionné précédemment, chez le rat, l'hypoxie semble augmenter la quantité de cytochrome P450 total (Longmuir et Pashko, 1976; Ou et coll., 1980; Bonkovsky et coll., 1986). Par exemple, Ou et coll. (1980) rapportent une augmentation de 30% du cytochrome P450 suite à une période prolongée d'hypoxie chez le rat. Par ailleurs, des études comportant de courtes expositions à l'hypoxie chez le rat et le lapin ont démontré une diminution du cytochrome P450 (Srivastava et coll., 1980; Jordi-Racine et coll., 1988; du Souich et coll., 1990). D'autres études chez le lapin ont montré que l'hypoxie *in vivo* diminue la biotransformation de médicaments telles la phénytoïne et la théophylline. Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par des différences dans le temps d'exposition, le milieu environnant normo ou hypobarique, le degré d'hypoxie et l'espèce utilisée (Jordi-Racine et coll., 1988).

4.2 Effet de l'hypoxie sur les cytochromes P450

L'effet de l'hypoxie sur l'expression des isoenzymes du cytochrome P450 est très mal documenté, toutefois une notion semble bien établie : l'hypoxie affecte différemment les cytochromes P450, tant leur niveau d'expression que leur activité. La majorité des études portant sur l'effet de l'hypoxie sur le métabolisme des médicaments démontrent des baisses du cytochrome P450 total, mesuré par sa liaison au CO, et d'activité de plusieurs cytochromes P450; baisses qui s'accompagnent de la diminution de la quantité de la protéine et de son ARNm. Cependant, l'hypoxie a aussi la capacité d'augmenter l'expression et l'activité d'autres isoformes (Srivastava et coll., 1980; Ou et coll., 1980; Jordi-Racine et coll., 1988; Fradette et coll., 2002). Nous allons discuter plus en détails dans les pages qui vont suivre des effets de l'hypoxie sur l'activité et l'expression des cytochromes P450.

4.2.1 Effet de l'hypoxie sur l'activité des cytochromes P450

De nombreuses observations *in vivo* indiquent que l'hypoxie diminue la clairance des médicaments, réduction associée à une baisse de l'activité du cytochrome P450, sans diminution de la quantité de la protéine. *In vitro*, l'activité catalytique des CYP4A des cellules épithéliales de la cornée de lapins soumises à l'hypoxie diminue sans que leur teneur en protéines soit changée (Mastyugin et coll., 2001). D'autres études ont démontré des diminutions de l'activité des CYP2D6 (Jurgens et coll., 2002), CYP1A1 et 1A2 (Gonzalez 1992; Guengerich 1992). Notre laboratoire a démontré que l'hypoxie diminue la quantité totale de cytochrome P450 mesurée par spectrophotométrie après la liaison du CO (Proulx et du Souich, 1995). Pour tenter

d'expliquer cette diminution, plusieurs hypothèses ont été proposées. Lors de l'hypoxie, des SOR générés pourraient être impliqués dans la réduction de la quantité totale de cytochrome P450. Une autre hypothèse porte sur la diminution même de l'oxygène disponible au cytochrome P450 pour être transféré au substrat (Jones, 1981; Angus et coll., 1990). Toutefois, des études récentes ne supportent pas cette hypothèse puisqu'il a été démontré que l'hypoxie pouvait aussi induire l'activité de certaines isoformes tels que les CYP2B1 et CYP2C8 (Grek et coll., 2001).

4.2.2 Effet de l'hypoxie sur l'expression des cytochromes P450

In vivo, l'hypoxie diminue l'expression génique de plusieurs cytochromes P450 tels les CYP1A1, 1A2 et 2J2 (Kurdi et coll., 1999; Yang et coll., 2001). Bien que les premières études réalisées dans le but d'examiner l'effet de l'hypoxie sur le cytochrome P450 démontraient une diminution de l'expression des isoformes étudiées (CYP1A1 et 1A2), des études toutes récentes montrent que l'hypoxie induit l'expression d'autres isoformes. En effet, *in vivo*, l'hypoxie modérée aiguë induit l'expression des CYP3A (Kurdi et coll., 1999; Patterson et coll., 1999; Raleigh et coll., 1998) et 4B1 (Mastyugin et coll., 2001). Toutefois, le ou les mécanismes sous-jacents à l'induction ne sont pas encore connus. Ces observations confirment que les isoformes sont différemment affectées par l'hypoxie ce qui implique l'existence de plusieurs mécanismes de régulation du cytochrome P450. L'induction et la répression des cytochromes P450 provoquées par l'hypoxie seront discutées davantage dans la discussion puisqu'elles font l'objet d'étude dans cette thèse.

4.3 Les mécanismes de régulation du cytochrome P450 lors d'hypoxie

Tel que mentionné précédemment, l'hypoxie affecte différemment l'expression des cytochromes P450 (Kurdi et coll., 1999; Patterson et coll., 1999). Chez les eucaryotes, le contrôle positif ou négatif de la transcription d'un gène est généralement accompli grâce à l'interaction de protéines régulatrices avec des séquences d'ADN spécifiques, résultant en une augmentation ou une diminution de la transcription (Rahman, 2002).

L'induction des cytochromes CYP3A6 et CYP4B1 suite à l'hypoxie a été très peu étudiée. Les seules données que nous possédons semblent attribuer l'induction du CYP4B1 à une augmentation de son ARNm (Patterson et coll., 1999; Raleigh et coll., 1998; Mastuygin et coll., 2001). Toutefois, il n'existe pas de données démontrant que l'augmentation du messenger est produite par une activation transcriptionnelle ou par sa stabilisation.

En ce qui concerne la régulation négative du cytochrome P450 par l'hypoxie, ce phénomène est mieux compris. L'inhibition de la transcription serait le mécanisme principalement responsable de la régulation négative. L'effet des cytokines pourrait être un mécanisme sous-jacent à la répression de la transcription des cytochromes P450 par l'hypoxie. En effet, l'hypoxie augmente la concentration plasmatique de plusieurs cytokines (Naldini et coll., 1997; Benyo et coll., 1997; Krishnaswamy et coll., 1999; Lacombe et Mayeux, 1999) et il a été démontré que certaines de ces cytokines peuvent

diminuer l'expression des cytochromes P450 (Bleau et coll., 2000). L'hypoxie *in vivo*, de même que les cytokines, peuvent induire l'activation de plusieurs facteurs de transcription tels le HIF-1, le AP-1 et le NF- κ B. Il a été démontré que l'activation de la voie de signalisation du HIF-1 par l'hypoxie diminue l'expression des CYP1A1 et 1A2 (Wenger, 2002). Les facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B peuvent aussi diminuer l'expression de certaines cytochromes P450 (Abdel-Razzak et coll., 1993; Iber et coll., 2001). Ces mécanismes seront expliqués plus en détail dans la discussion.

Il n'existe aucune donnée à ce jour qui associe l'induction ou la régulation négative des cytochromes P450 lors de l'hypoxie à des changements de la traduction (synthèse protéique) ou à la vitesse de dégradation. Cependant, suite à des études effectuées avec des cytokines comme le IFN- γ , cytokine qui est induite par l'hypoxie, il a été proposé que cette dernière provoquait une dégradation et/ou une diminution de la traduction du CYP2C (Calleja et coll., 1998). Des études approfondies s'avèrent nécessaires afin évaluer l'importance de ce mécanisme.

CHAPITRE 5

RÔLE PHYSIOLOGIQUE DU CYTOCHROME P450

5. LE RÔLE PHYSIOLOGIQUE DU CYTOCHROME P450

Lors de sa découverte, la seule fonction attribuée au cytochrome P450 était le métabolisme de xénobiotiques pharmacologiquement actifs, potentiellement toxiques ou cancérigènes en métabolites non-toxiques (Pessayre, 1993). Ce n'est que quelques années plus tard qu'il a été découvert que ce remarquable système n'était pas sans inconvénients. En effet, alors que de nombreux xénobiotiques sont transformés par le cytochrome P450 en métabolites stables, d'autres forment au contraire des métabolites réactifs qui peuvent être mutagènes, cancérigènes ou entraîner des lésions tissulaires. Une augmentation de radicaux libres de l'oxygène par les cytochromes P450 peut provoquer des dommages cellulaires irréversibles, telles que la peroxydation des lipides ainsi que la dénaturation oxydative des acides aminés et des bases azotées (Pessayre, 1993; Beaune, 1993; Roman, 2002).

La peroxydation des lipides constitués d'acides gras polyinsaturés résulte en une désorganisation des structures membranaires entraînant le dysfonctionnement des protéines qui y sont imbriquées ainsi que la libération de pentane et d'aldéhydes qui, à fortes concentrations, s'avèrent toxiques pour la cellule. La dénaturation oxydante des acides aminés, conduit à la déstabilisation des structures secondaires et tertiaires des protéines, ainsi qu'à l'inactivation des enzymes. La modification des bases azotées par les radicaux libres de l'oxygène provoque, quant à elle, un arrêt ou une aberration de l'expression du message génétique dans la cellule (Pessayre, 1993; McCord, 2000; Blokhina et coll., 2003). Au niveau des organes, si ces radicaux libres de l'oxygène sont formés de façon sporadique mais en forte quantité, les dommages cellulaires vont

d'avantage conduire à une nécrose des tissus; par contre, si les radicaux libres de l'oxygène sont générés de façon continue mais à des concentrations modérément plus élevées que la concentration basale, il sera plus probable d'assister à une croissance anormale des tissus, c'est-à-dire à l'apparition d'un cancer (Pessayre, 1993; Brass et coll., 1991; Blokhina et coll., 2003).

Au cours des années 1970, il est devenu apparent que certains xénobiotiques étaient actifs à l'état non-métabolisé tandis que d'autres substances devenaient actives seulement après biotransformation, établissant alors le concept d'activation (Pelkonen et Nebert 1982, Ioannides et Parke 1987, 1990; Guengerich et Shimada 1991). Ce concept d'activation a alors mené à la découverte de nombreuses pro-drogues, mais surtout à la découverte du métabolisme de substances endogènes par le cytochrome P450. Ce n'est qu'il y a 20 ans que les cytochromes P450 ont été reconnus comme des enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif des endobiotiques, tels que les hormones, les prostaglandines, les leucotriènes, les vitamines solubles et les acides gras, en particulier l'acide arachidonique (Capdevila et coll., 1992). Ainsi, un rôle physiologique a été associé au cytochrome P450. Dans les pages qui vont suivre, nous allons présenter le rôle du cytochrome P450 dans la biotransformation de plusieurs substances endogènes.

5.1 Le métabolisme des hormones

Les isoformes de la famille CYP11 du cytochrome P450 est un bon exemple d'enzymes impliquées dans le métabolisme de substances. En effet, cette famille est le

catalyseur de l'étape initiale de la conversion du cholestérol en stéroïdes (Pikuleva et Waterman, 1999). Le cytochrome P450 participe aussi au métabolisme d'hormones telles l'oestradiol et la testostérone. Le métabolisme de l'oestradiol par le cytochrome P450 mène à la formation de composés génotoxiques. Ainsi, l'oestradiol est converti en quinone par les CYP1A dans les tissus extrahépatiques et par les CYP3A (Hutchison et coll., 1999).

5.2 Le métabolisme des acides gras

Les CYP2C8, 2C9 et 3A4 contribuent au métabolisme de l'acide rétinoïque en plus de participer au métabolisme des médicaments. Le métabolisme de l'acide arachidonique (AA) par le cytochrome P450 est de loin celui qui a été le plus étudié. Plus de 300 articles ont été publiés pendant les cinq dernières années sur le métabolisme de l'AA par le cytochrome P450. Les cytochromes P450 peuvent catalyser trois types de réactions (Capdevila et coll, 1992; Fitzpatrick et Murphy, 1988 ; Frazier et Yorio, 1992 ; Karara et coll., 1989) : (i) l'oxydation allylique de l'AA qui forme les acides 5-, 8-, 9-, 11-, 12- et 15-hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs), (ii) l'oméga hydroxylation de l'AA qui produit les 19- et 20-HETEs et (iii) l'époxydation de l'AA qui forme les acides époxyeicosatriénoïques (EET) (Frazier et Yorio, 1992). Plusieurs cytochromes P450 participent au métabolisme de l'AA, par exemple les membres des sous-familles CYP4A, 4B et 4F catalysent la formation des HETEs, alors que les sous-familles CYP1A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2J et 4A génèrent des EETs. Certains EETs et HETEs dérivés de la voie époxygénase du cytochrome P450 ont des actions biologiques importantes, incluant la libération d'hormones peptidiques des cellules endocrines, l'inhibition du

canal Na^+/K^+ -ATPase rénal (Schwartzman et coll., 1985 ; Schwartzman et McGiff, 1995), la mobilisation du Ca^{2+} microsomal des muscles lisses aortiques et des cellules pituitaires (Snyder et coll., 1986 ; Kutsky et coll., 1983), l'angiogenèse et la vasodilatation des artères (Catella et coll., 1990 ; Fitzpatrick et Murphy, 1988). Les métabolites produits par des cytochromes P450 à partir de l'AA jouent aussi un rôle important dans la régulation de la croissance cellulaire. L'inhibition de la voie du cytochrome P450 diminue la prolifération de cellules (Sellmayer et coll., 1991).

5.3 Le monoxyde d'azote (oxyde nitrique, NO^\bullet)

Le monoxyde d'azote, ou oxyde nitrique (NO^\bullet) est un gaz composé d'un atome d'azote et d'un atome d'oxygène. Jusqu'à la fin des années 1980, l'oxyde nitrique était uniquement reconnu comme un polluant de l'environnement. En 1987, il a été démontré que la molécule d'oxyde nitrique était impliquée dans de multiples processus physiologiques (Palmer et coll., 1987; Brennan et Moncada, 2002). Notamment, le NO^\bullet est responsable de la dilatation physiologique des vaisseaux sanguins. Le NO^\bullet joue un rôle déterminant dans de nombreux processus biochimiques du corps humain : c'est un messager qui transmet des signaux dans les systèmes cardiovasculaire, nerveux central et immunologique. Le NO^\bullet agit également comme régulateur du métabolisme des cellules (Brennan et Moncada, 2002).

L'unique voie de synthèse du NO^\bullet connue à ce jour est à partir de la L-arginine grâce à la NO-synthase. Il a été démontré que la NO-synthase est une enzyme héminique dont la structure ressemble tout particulièrement à celle du cytochrome P-

450. C'est pourquoi Mansuy et Boucher ont récemment postulé que le cytochrome P450 pourrait générer des dérivés nitrés tout comme la NO-synthase (Morgan et coll., 2001). À ce jour, il n'y a cependant aucune donnée expérimentale dans la littérature qui confirme que le cytochrome P450 pourrait générer du NO[•] à partir d'un substrat endogène. Cette avenue de recherche sera couverte plus en détail dans la discussion. La possibilité que le cytochrome P450 participe à la production de NO[•] endogène, soulève de multiples hypothèses puisque, comme il sera décrit dans les paragraphes qui vont suivre, cette molécule est responsable de nombreux effets physiologiques importants.

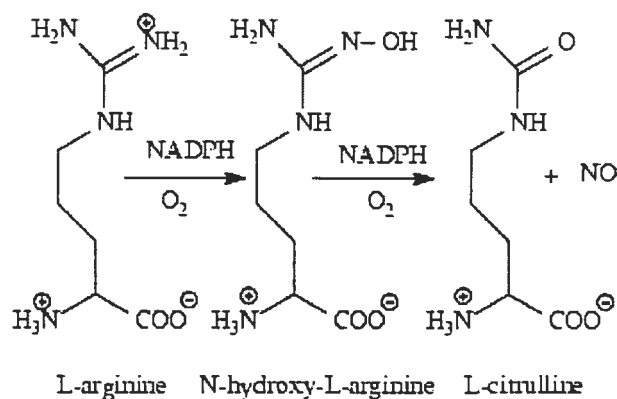
En présence de NADPH, d'oxygène, de fer, de tétrahydrobioptérine, de FAD et de FMN, la NO-synthase (NOS) transforme l'arginine en hydroxyarginine qui, après réduction, est transformée en NO[•] et citrulline selon la réaction présentée dans la figure 5.1. On distingue trois types d'isoenzymes NO-synthases : l'isoenzyme de type I (NOS1), présente dans les neurones et les cellules épithéliales, l'isoenzyme de type II (NOS2), présente dans différents types de cellules, dont les macrophages, et l'isoenzyme de type III (NOS3), présente essentiellement dans les cellules endothéliales. Les NO-synthases de type I et III sont constitutives. La NO-synthase inductible de type II est présente dans les macrophages, les neutrophiles et les hépatocytes. Sous l'influence de cytokines, notamment de l'interleukine-1, du TNF ("tumor necrosis factor alpha"), de l'IFN- γ (interféron-gamma) et des lipopolysaccharides, l'expression de la NOS2 est augmentée. L'induction de la NOS2 par effet génomique nécessite un délai de plusieurs heures, mais la NO-synthase induite est immédiatement active après sa synthèse et entraîne une libération prolongée et très importante de NO[•] (del Zoppo et coll., 2000).

Figure 5.1

Biosynthèse du NO à partir de la L-arginine

La synthèse de NO s'effectue à partir de la L-arginine grâce à la NO-synthase. La NO-synthase, NOS, transforme l'arginine en hydroxyarginine qui, après réduction, est transformée en NO et citrulline (Brennan et Moncada, 2002).

Figure 5.1
Biosynthèse du NO à partir de la L-arginine



Le NO[•] est une molécule gazeuse instable qui dans l'organisme est transformée spontanément, en raison de la présence d'oxygène, en nitrite NO²⁺ puis en nitrate NO³⁺. Plusieurs dérivés de l'arginine, comme la monométhyl-L-arginine qui est présente dans le plasma de malades atteints d'une insuffisance rénale, sont des inhibiteurs des NO-synthases (Leiper et Vallance, 1999).

Le NO[•] diffuse à travers les membranes et pénètre dans toutes les cellules voisines de celles qui le libèrent. Libéré par l'endothélium vasculaire, le NO[•] pénètre dans les fibres musculaires lisses. Libéré par les terminaisons présynaptiques neuronales, le NO[•] diffuse dans les éléments postsynaptiques et, d'une manière rétrograde, dans les terminaisons présynaptiques qui l'ont libéré et augmente la libération de glutamate (Prast et Philippu, 2001).

Le monoxyde d'azote NO^* , comme le monoxyde de carbone CO , a une grande affinité pour le fer; il module l'activité de diverses enzymes contenant du fer. Il active entre autres la guanylate cyclase. Cette activation provoque la transformation du guanosine triphosphate, GTP, en guanosine mono-phosphate cyclique, GMPc (voir figure 5.2) (Murad, 1994).

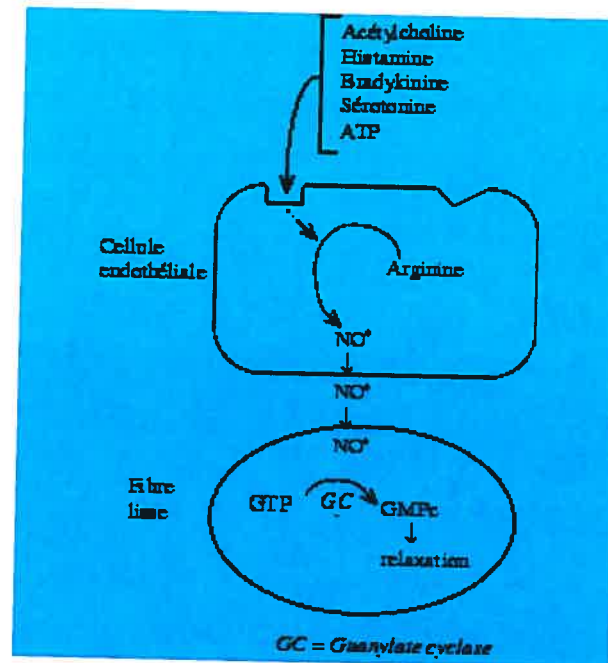
Figure 5.2

NO[•] : biosynthèse par la cellule endothéliale et effets sur la fibre lisse.

Le NO[•] active la guanylate cyclase. Cette activation provoque la transformation du guanosine triphosphate, GTP, en guanosine mono-phosphate cyclique, GMP cyclique, dont l'augmentation est responsable de la modulation de l'activité de diverses protéines kinases qui provoquent une hyperpolarisation ayant pour conséquence entre autres la relaxation des fibres vasculaires lisses. Le GMP cyclique formé est ensuite inactivé par des phosphodiesterases qui le transforment en 5'GMP inactif (Adapté de Brennan et Moncada, 2002).

Figure 5.2

NO[•]: biosynthèse par la cellule endothéliale et effets sur la fibre lisse



Adaptée de <http://www.pharmacorama.com>

L'augmentation de GMPc est responsable de la modulation de l'activité de diverses protéine kinases qui, en favorisant la sortie de potassium et de calcium hors de la cellule, provoquent une hyperpolarisation ayant pour conséquence la relaxation des fibres musculaires lisses, c'est-à-dire la vasodilatation, la bronchodilatation, le relâchement de l'estomac après le repas pour l'adapter au contenu alimentaire et l'inhibition de l'agrégation et de l'adhésion plaquettaires à l'endothélium (Brennan et Moncada, 2002). De plus, le GMPc peut inhiber, sans que l'on sache l'importance des conséquences de cette inhibition, des enzymes non héminiques comportant un atome de fer lié à des atomes de soufre telles la ribonucléotide réductase, nécessaire à la synthèse

du DNA puisqu'elle transforme un ribonucléotide en déoxyribonucléotide, la NADPH/ubiquinone-oxydoréductase ou complexe mitochondrial I et la succinate-ubiquinone-oxydoréductase ou complexe mitochondrial II (Radi et coll., 2002).

Le NO^\bullet peut aussi intervenir dans le métabolisme intracellulaire du fer par un mécanisme complexe. La biosynthèse des récepteurs de la transferrine, de la ferritine et de l'ALA synthase (delta-aminolevulinic acid synthase) est régulée par une protéine intracytoplasmique IRP-1 (iron regulatory protein) qui en interagissant avec des séquences de mRNA appelées IRE (iron response elements) régule la traduction des récepteurs. Un excès de NO^\bullet conduit à sa liaison au fer, ce qui est traduit comme une déficience intracytoplasmique en fer; cette diminution de fer stimule alors la biosynthèse des récepteurs de la transferrine et inhibe la synthèse des récepteurs à la ferritine et de l'ALA synthase, ce qui entraîne une anémie. Le NO^\bullet produit en excès au cours d'un état inflammatoire chronique pourrait ainsi être à l'origine d'une anémie dite de type inflammatoire (Radi et coll., 2002).

Tel que mentionné précédemment, le NO^\bullet interagit avec un certain nombre de molécules autres que des enzymes comme par exemple l'ion superoxyde O_2 pour générer l'anion peroxynitrite ONOO^- qui, après protonation, se décompose en radical OH^\bullet et en radical dioxyde d'azote NO_2^\bullet . Le NO^\bullet peut aussi réagir avec l'hémoglobine, avec une affinité 100 000 fois plus importante que celle de l'oxygène (Salvemini et Cuzzocrea, 2002).

De par ses effets multiples, et sans doutes d'autres pas encore identifiés, le NO[•] exerce divers effets encore à préciser : dans la mémorisation et la régulation du sommeil, dans la différenciation, la maturation et la mort cellulaire (apoptose), dans l'angiogenèse, dans l'inflammation et dans l'effet cytotoxique des lymphocytes et des macrophages (Prast et Philippu, 2001; McLeod et coll., 2001; Radi et coll., 2002; Brennan et Moncada, 2002).

Alors que le NO[•] était considéré initialement comme n'ayant que des effets bénéfiques, les études actuelles montrent qu'une production endogène excessive de NO[•] peut avoir des effets néfastes : par exemple, à concentration élevée, le NO[•] provoque des lésions cérébrales, peut-être par libération excessive de glutamate responsable de l'ouverture de canaux cationiques. Le NO[•] jouerait un rôle dans la genèse de la maladie de Parkinson et au cours du choc septique. L'excès de NO[•] pourrait participer à l'altération des cellules β du pancréas lors de l'installation du diabète. Le NO[•] pourrait aussi stimuler le développement de certaines tumeurs ainsi que l'angiogénèse (Fernandes et coll., 2002; Marette, 2002; Brennan et Moncada, 2002).

Objectifs généraux des travaux

L'objectif principal de la recherche sur l'effet de l'hypoxie sur le cytochrome P450 vise à comprendre comment l'hypoxie peut à la fois augmenter et diminuer l'activité et/ou l'expression de certains cytochromes P450, et quels sont les avantages et les inconvénients potentiels d'un tel phénomène. Ainsi, au niveau clinique, les buts à long terme sont de réduire l'incidence des effets secondaires des médicaments, de diminuer les coûts engendrés et de favoriser le développement d'une stratégie afin d'améliorer le traitement des patients souffrant de maladies impliquant de l'hypoxie.

Un des défis consiste à identifier les cytochromes P450 dont l'activité et l'expression sont plus sévèrement affectées durant l'hypoxie afin de prédire les interactions cliniques possibles entre la maladie et la médication. Ceci requiert donc : 1- de connaître les isoenzymes impliquées dans le métabolisme d'un agent donné; 2- de comprendre comment ces enzymes sont affectées lors de l'hypoxie; et 3- de pouvoir extrapoler à l'humain les observations faites chez l'animal.

Les objectifs immédiats consistent à identifier les médiateurs responsables des changements d'activité et/ou d'expression du cytochrome P450 hépatique lors de l'hypoxie et de connaître les isoformes affectées. Il est également important de déterminer les voies de transduction du signal mises en jeu après la liaison de ces médiateurs à leur récepteurs et de cibler les divers mécanismes qui mènent à la régulation négatives et/ou à l'induction du cytochrome P450, soit un effet sur la

protéine elle même (modification post-traductionnelle) ou au niveau de l'expression des gènes des CYP.

À ce jour, les mécanismes de régulation de l'activité et de l'expression des gènes du cytochrome P450 en conditions normales demeurent en partie inconnus; l'identification des facteurs impliqués durant l'hypoxie devrait fournir des informations supplémentaires permettant de mieux comprendre les mécanismes mis en oeuvre chez les sujets sains.

Objectifs et hypothèses spécifiques des travaux de doctorat

Chez l'humain, les maladies se présentant avec de l'hypoxie peuvent produire une régulation négative ainsi que diminuer l'activité des isoformes constituant le cytochrome P450. Par conséquent, la vitesse de biotransformation de nombreux médicaments est réduite, ce qui requiert un ajustement des dosages pour prévenir des effets indésirables. Des études *in vivo* avec des lapins ont montré que l'hypoxie aiguë diminue la clairance de médicaments dont la biotransformation est réalisée par les cytochromes CYP1A1 et 1A2. De plus, toujours *in vivo* chez le lapin, l'hypoxie augmente le CYP3A6 ainsi que la peroxydation des lipides (Barakat et du Souich, 1996; Galal et du Souich, 1999). À ce jour, les mécanismes de régulation de l'activité et de l'expression des gènes du cytochrome P450 en présence d'hypoxie ne sont toujours pas connus. L'identification des facteurs impliqués dans les changements d'activité et d'expression du cytochrome P450 pendant l'hypoxie permettra de mieux comprendre les mécanismes qui régulent ce système.

Nous avons tout d'abord émis comme hypothèse que l'hypoxie pouvait induire la formation de médiateurs sériques responsables des changements de l'activité et de l'expression du cytochrome P450. Notre premier objectif était donc de déterminer si l'hypoxie induisait la formation de médiateurs sériques.

Une fois la présence de médiateurs sériques confirmée, l'étape suivante était d'élucider la nature des médiateurs. Les études publiées à ce jour associent la présence de cytokines aux changements d'activité et d'expression du cytochrome P450 (Bleau et coll., 2001; Morgan, 2001). Nous avons donc émis comme hypothèse que les médiateurs sériques étaient des cytokines.

Sachant que les cytokines étaient responsables des changements d'activité et d'expression des cytochromes P450 produits par l'hypoxie, l'étape suivante était de déterminer les voies de transduction du signal mises en jeu. De nombreux chercheurs ont rapporté que l'hypoxie active plusieurs voies de signalisation et facteurs de transcription. Le facteur de transcription qui paraît jouer le rôle le plus important pour orchestrer les réactions de la cellule face à l'hypoxie est le HIF-1 (hypoxia inducible factor-1). Un autre facteur de transcription apparemment impliqué dans la régulation de l'expression de nombreuses protéines liées à l'hypoxie est le AP-1 (activating protein) (Semenza, 2000; Salnikow et coll., 2002). Nous avons donc émis l'hypothèse que ces deux facteurs de transcription, le HIF-1 et le AP-1, étaient impliqués dans les changements de régulation du cytochrome P450 par l'hypoxie. L'objectif était alors de caractériser les voies de signalisation menant aux changements d'expression des

CYP1A1/1A2 et 3A6 en se concentrant sur deux protéines induites par l'hypoxie, le HIF-1 et le AP-1.

L'induction du cytochrome P450 CYP3A6 par l'hypoxie suggère que cet isoforme a un rôle dans le maintien de l'homéostasie cellulaire ou encore tissulaire lors de l'hypoxie. Cette hypothèse était en accord avec le fait que de plus en plus d'études attribuent des rôles physiologiques au cytochrome P450 (Roman, 2002). Des études préliminaires nous ont démontré que les hépatocytes en culture produisent de l'oxyde nitrique même 72 heures après la mise en culture lorsque l'expression de la NO-synthase est très faible. Ces résultats suggéraient que le NO[•] est produit par d'autres enzymes que la NOS2 dans l'hépatocyte. Nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation de l'expression de l'isoforme CYP3A6 du cytochrome P450 par l'hypoxie avait comme but la production de NO[•]. L'objectif de ce projet était donc de vérifier si les enzymes du cytochrome P450, entre autres le CYP3A6, contribuent à la formation de NO[•], de caractériser les cytochromes P450 impliqués et puis finalement d'élucider les mécanismes sous-jacents à la formation de NO[•] par le cytochrome P450.

DEUXIÈME PARTIE

PRÉSENTATION DES ARTICLES

CHAPITRE 6

HYPOXIA-INDUCED DOWN-REGULATION OF CYP1A1/1A2 AND UP-REGULATION OF CYP3A6 INVOLVES SERUM MEDIATORS

Caroline Fradette¹, Anne-Marie Bleau¹, Vincent Pichette¹, Nathalie Chauret² and
Patrick du Souich¹

British Journal of Pharmacology (2002) 137(6), 881-891.

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montréal,
Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

²Merck Frosst Centre for Therapeutic Research, P.O. Box 1005, Pointe Claire-Dorval,
Québec,

Canada H9R 4P8.

Abstract

1 Acute moderate hypoxia modifies the catalytic activity and expression of certain isoenzymes of hepatic cytochrome P450 (P450). The aim of this study was to document whether hypoxia depresses hepatic P450 directly or through the release of serum mediators.

2 Rabbits were subjected to a FiO_2 of 8% for 48 h, sacrificed, and serum and hepatocytes were isolated; hepatocytes from control and rabbits with hypoxia were incubated with serum from control and hypoxic rabbits for 4 and 24 h, and total P450 content, CYP1A1, 1A2 and 3A6 activities and expressions were assessed. Sera were fractionated by size exclusion chromatography and fractions tested for their ability to modify activity and amount of P450, and serum mediators were identified through neutralisation experiments.

3 Total serum and fractions with proteins of 15-23 and 65-94 kDa of M_r reduced P450 content and expression of CYP1A1, 1A2 and 3A6, as well as *CYP1A1*, *1A2* and *3A6* mRNA. Total serum and the fraction with 32-44 kDa proteins increased CYP3A6 activity and protein and mRNA. The serum mediators implicated in the decrease in activity and expression of CYP1A1, 1A2 and 3A6 were interferon- γ (IFN- γ), interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-2. Erythropoietin (Epo) was partly responsible for the increase in P450 content and CYP3A6 expression.

4 In conclusion, acute moderate hypoxia diminishes the activity and expression of CYP1A1, 1A2 and *CYP1A1*, *1A2* mRNA, and increases CYP3A6 protein, activity and *CYP3A6* mRNA. Several mechanisms contribute to these changes in P450, among them the release of cytokines acting as serum mediators.

Key words: cytochrome P450, CYP1A1, CYP1A2, CYP3A6, hypoxia, inactivation, down-regulation, interferon- γ , interleukin-1 β , interleukin-2, erythropoietin.

Abbreviations: AhR is aryl hydrocarbon receptor; Arnt is aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator; 1,3DMU is 1,3-dimethyluric acid; DFB is (3,4-difluorobenzyl)-4-(4-methylsulfonyl)phenyl)-5,5-dimethyl-(5-*H*)furan-2-one); DFH is (hydroxy)-4-(4-methylsulfonyl)phenyl)-5,5-dimethyl-(5-*H*) furan-2-one); Epo is erythropoietin; FiO₂ is fractional concentration of inspired O₂; H_{CONT} is hepatocytes from control rabbits; 13-HETE is 13-hydroxyeicosatrienoic acid; H_{HYP}O is hepatocytes from rabbits with hypoxia; HIF-1 is hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activator; H₂O₂ is hydrogen peroxide; IFN- γ is interferon- γ ; IL-1 β is interleukin-1 β ; M_r is relative molecular mass; 1MU is 1-methyluric acid; 3MX is 3-methylxanthine; NO^{*} is nitric oxide; P450 is cytochrome P450; PI3-K is phosphatidylinositol 3-kinase; ROI is reactive oxygen intermediates; S_{CONT} is serum from control rabbits; S_{HYP}O is serum from rabbits with hypoxia; TNF- α is tumour necrosis factor; WME is William's medium E.

Introduction

The clearance of theophylline can be decreased in patients with chronic obstructive lung disease, pulmonary oedema, pulmonary heart disease or congestive heart failure (Powell *et al.*, 1978). Since patients with these disease states present episodes of acute hypoxia, the decrease in theophylline metabolic clearance has been ascribed to hypoxia (Richer & Lam, 1993). Early *in vivo* and *in vitro* studies supported that acute hypoxia reduces the activity of multiple biotransformation pathways (Jones, 1981). Modulation of cytochrome P450 (P450) by hypoxia was confirmed *in vivo* in animals with acute moderate hypoxia where the clearance of theophylline was reduced (Letarte & du Souich, 1984). Moreover, sub-chronic hypoxia also reduces the activity and expression of enzymes involved in the biotransformation of drugs (Shan *et al.*, 1992). Supporting that in man hypoxia modulates P450, it has been shown that in patients with congestive heart failure, total hepatic P450 content is reduced, as well as the expression of CYP1A1 and 1A2 isoenzymes (Ng *et al.*, 2000). Interestingly, *in vivo*, in rabbits subjected to acute hypoxia, the expression of CYP3A6 is enhanced (Kurdi *et al.*, 1999).

In vivo, the effect of hypoxia on P450 resembles that elicited by an acute local inflammatory reaction, e.g. there is a decrease in activity and down-regulation of several P450 isoforms, with the exception that an inflammatory reaction also down-regulates CYP3A (Morgan, 1997). In rabbits with a turpentine-induced inflammatory reaction, interleukin-6 (IL-6) is the serum mediator responsible for the decrease in activity of P450 isoforms; IL-1 β , tumour necrosis factor (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ) have a minor role (Bleau *et al.*, 2000).

Hypoxia prompts the release of numerous cytokines, such as IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α and IFN- γ (Naldini *et al.*, 1997), and erythropoietin (Epo) (Lacombe & Mayeux, 1999). We speculated that these cytokines might mediate the changes in hepatic P450 isoforms in animals subjected to acute moderate hypoxia. This hypothesis was supported by the fact that these cytokines can induce changes in the expression of P450 genes (Calleja *et al.*, 1997; 1998).

The aims of the present study were to assess whether acute moderate hypoxia triggers the release of serum mediators eventually leading to changes in P450 content and activity. To document the presence of serum mediators, P450 content, activity and amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins and genes were assessed following 4 and 24 h incubation periods of hepatocytes with sera from rabbits with acute moderate hypoxia. Mediators in sera were isolated by size-exclusion high performance liquid chromatography, and the potential effect of IL-2, IL-1 β , IL-6, IFN- γ and Epo, on P450 isoforms was counterbalanced by direct neutralisation with antibodies. In rabbits with moderate acute hypoxia, IFN- γ is the primary serum mediator responsible for the depression of CYP1A1 and 1A2 proteins and mRNA, and Epo is partly responsible for the up-regulation of CYP3A6 protein and gene.

Materials and Methods

Animals and hepatocyte collection

Male New Zealand White rabbits (1.8-2.2 Kg) were obtained from Ferme Charles Rivers (St-Constant, Quebec, Canada). Rabbits were maintained on Purina Laboratory Chow and water *ad libitum* for at least 7 days before any experimental work was undertaken. To induce the hypoxia, rabbits were introduced in a plexiglas chamber ($0.75 \times 1.20 \times 1.25 \text{ m}^3$) with a fractional concentration of inspired O_2 (FiO_2) of 8%, adjusted with an oxygen monitor (OM-15, Sensor Medics Corp., CA, U.S.A.) connected to an electrovalve (Asco Valves, Brantford, Ontario, Canada) that allowed the access of nitrogen into the chamber which displaced the air off. All the rabbits had access to Purina Laboratory Chow and water *ad libitum* for the 48 h that lasted the hypoxia. Control rabbits were also placed into the chamber for the experiments, but breathing room air ($\text{FiO}_2 = 21\%$). All the experiments were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for use of laboratory animals.

Hepatocytes from rabbits with hypoxia (H_{HYPO}) and from control rabbits (H_{CONT}) were isolated 48 h after the induction of hypoxia or breathing room air, respectively, according to the two step liver perfusion method of Seglen (1976) with minor modifications (El-Kadi *et al.*, 1997). Briefly, rabbits were anaesthetised with sodium pentobarbitone (30 mg kg^{-1}), a midline laparotomy was performed and the portal, the suprahepatic and inferior cava veins were cannulated. The liver was perfused via the portal vein with a solution containing 15 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM KH_2PO_4 , 25 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 5.5 mM glucose, and 56.8 mg ml^{-1} heparin with a peristaltic pump (Harvard Apparatus Co., Inc., U.S.A.), followed by a perfusion with a solution of

0.013% collagenase, 1 mM CaCl_2 and 0.25 mM trypsin inhibitor. All solutions were maintained at 37°C and saturated with 100% O_2 . The liver was maintained wet with saline during the entire period of perfusion. Living cells were isolated on a 40% Percoll gradient. Viability was assessed by trypan blue exclusion to ensure that it was greater than 90%; viability was not affected by hypoxia or any experimental condition. Cell concentration was adjusted to $4 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ with William's medium E (WME) supplemented with 10% calf serum and 1 μM insulin. Aliquots of 2 ml of the hepatocytes in suspension were transferred into 6-well plastic culture plates (Falcon, Becton Dickinson Labware, Rutherford, NJ) coated with type 1 rat tail collagen and incubated for 4 and 24 h at 37°C in an atmosphere of 95% O_2 and 5% CO_2 . Cell cultures were always conducted under sterile conditions.

Rabbit serum preparation

Blood samples (10 ml) were withdrawn from the rabbits 48 h after the induction of hypoxia and from control rabbits in a sterile Vacutainer Brand SST (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada). Blood samples were allowed to clot at room temperature for 2 h, thereafter were centrifuged at 2500 r.p.m. for 5 min, and the serum was decanted and stored frozen at -20°C in 1 ml aliquots until use. Preliminary studies have shown that when samples were handled as described, serum mediators conserved their activity for up to 12 months.

Fractionation of serum proteins

Serum proteins were separated by size exclusion high performance liquid chromatography (HPLC) on a Superose 12 HR column from Pharmacia Biotech (Baie

d'Urfé, Quebec, Canada). Flow rate of the mobile phase was set at 0.3 ml min^{-1} and column pressure was maintained between 9 to 12 bar with a LKB 2150 HPLC pump (Bromma, Sweden). Absorbance was measured at 280 nm with a Waters 490E spectrophotometric detector (Millipore, Milford, MA, U.S.A.). The eluant buffer included 115 mM NaCl, 5 mM KCL, 1 mM KH_2PO_4 , 1 mM HEPES, 25 mM EGTA, and 5.5 mM glucose; the pH of the solution was adjusted to 7.4 and filtered through a nylon mesh (pore size $0.22 \text{ }\mu\text{m}$). Serum aliquots of $300 \text{ }\mu\text{l}$ were injected into the column and fractions of 1.2 ml were collected with a fraction collector (LKB 2211 Superrac). To calculate the relative molecular mass (M_r) of the serum proteins contained in each HPLC fraction, a calibration curve was established by injecting $300 \text{ }\mu\text{l}$ of the buffer containing a mixture of six standard proteins ($100 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$): L-glutamic dehydrogenase (55.6 kDa), aldolase (39.2 kDa), triosephosphate isomerase (26.6 kDa), trypsin inhibitor (26.6 kDa), cytochrome c (12.5 kDa) and aprotinin (6.5 kDa). The proteins isolated in the first fraction were assumed to have a M_r greater than 95 kDa, considering that the column sorts out proteins with a M_r lower than 95 kDa.

In order to increase inhibitory activity of the fractions collected, these were concentrated on Microsep 3K membranes (Pall Filtron, Northborough, MA. U.S.A.) which retain proteins greater than 3 kDa. Three ml of the fractions were added to the sample reservoir and centrifuged at $75000 \times g$ to reduce the volume and hence concentrate serum fractions 1.25 times.

Experimental protocol

The efficiency of serum mediator(s) to modify hepatic P450 content and activity was characterised by incubating hepatocytes from control rabbits and from rabbits with hypoxia with 200 μ l of total serum or 200 μ l of the HPLC fractions for 4 and 24 h, and assessing total P450 content and activity. Controls included hepatocytes incubated for 4 and 24 h in absence of serum, and H_{CONT} incubated for 24 h with HPLC fractions of serum from control rabbits (S_{CONT}). Hepatic P450 content was measured spectrophotometrically in cell lysates as described by Omura & Sato (1964). The amount of proteins in hepatocytes was measured in cell lysates by the method of Lowry *et al.* (1951).

The effect of serum mediators on the activity of CYP1A1 and 1A2 was determined by measuring the ability of the hepatocytes to biotransform theophylline to 3-methylxanthine (3MX), 1-methyluric acid (1MU) and 1,3-dimethyluric acid (1,3DMU) (Kurdi *et al.*, 1999). Theophylline was dissolved in serum-free WME, and 100 μ l were added to each well and incubated for 4 and 24 h with the hepatocytes at a final concentration of 176 μ M. At time zero, 350 μ l of the supernatant were collected from each well (control sample). The remaining supernatant was collected following 4 and 24 h of incubation and frozen at -20°C until theophylline, 3MX, 1MU and 1,3DMU were assayed by HPLC (Kurdi *et al.*, 1999). The effect of serum mediators on the activity of CYP3A6 was determined by measuring the ability of the hepatocytes to convert 3,4-difluorobenzyl-4-(4-methylsulfonyl)phenyl)-5,5-dimethyl-(5-*H*)furan-2-one (DFB), a reported CYP3A4 probe in humans and rabbits to DFH, its fluorescent des-(difluoro)-benzyl metabolite (Chauret *et al.*, 1999; unpublished observations).

Incubations were performed according to a published procedure (Silva & Nicoll-Griffith, 2001). Briefly, 60 μ M DFB was incubated with the hepatocytes for 15 min. An aliquot of the media was then transferred to a microtiter plate and quenched with an equal volume of acetonitrile containing 40% TRIS buffer (0.05M). The fluorescence of the metabolite DFH was measured at excitation and emission wavelengths of 360 nm and 440 nm, respectively, using a fluorescent plate reader, and expressed in arbitrary units.

The information about the activity and expression of P450 isoenzymes in hepatocytes obtained after 4 h of incubation with saline, e.g. in absence of serum or its fractions, was assumed to reflect the repercussions of 48 h of *in vivo* hypoxia on hepatic P450.

Western blot analysis

Hepatocytes were washed, harvested in ice-cold PBS and centrifuged at 1500g for 5 min. The pellet was resuspended in cold lysis buffer (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, protease inhibitor mixture), and cells were allowed to swell on ice for 15 min, and vortexed for 30 s. For Western blot analysis, 50 μ g of cell lysate were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% polyacrylamide) (Smith, 1994). Separated proteins were electrophoretically transferred to a nitro-cellulose membrane using a semi-dry transfer process (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.). CYP1A1 and 1A2 were detected with a polyclonal anti-rabbit CYP1A1 (Oxford Biochemical Research, Oxford, MI, U.S.A.) diluted 1:100 in 5% nonfat milk in PBS/0.1% Tween 20 and visualized with an alkaline

phosphatase conjugated secondary antibody using nitro blue tetrazolium as substrate (Kruger, 1994). CYP3A6 was detected with a monoclonal anti-rat CYP3A1 (Oxford Biochemical Research, Oxford, MI, U.S.A.) diluted 1:500 in 5% nonfat milk in PBS/0.1% Tween 20 using a secondary antibody conjugated with chemiluminescence reagent (horseradish peroxidase enzyme) and visualized by autoradiography (Thorpe *et al.*, 1985). The assay was linear in the range of protein amounts assessed under the present experimental conditions. The intensities of the bands were measured with the software Un-Scan-It-Gel (Silk Scientific Inc., Orem, Utah) and are represented in arbitrary units.

Northern blot analysis of CYP1A1, 1A2 and 3A6 mRNAs

Following 4 or 24 h of incubation, liver cells were washed in 3 ml PBS and flash-frozen in liquid nitrogen. Samples were kept at -80°C until RNA extraction and quantification according to the method described by Leblond *et al.* (2001). Total RNA was isolated using 1 ml of TRIZOL Reagent (Life Technologies Inc.) per $5\text{--}10 \times 10^6$ cells. RNA concentration was measured spectrophotometrically at the absorbance of 260 nm ($A_{260/280}$ ratio ≈ 2). Total RNA samples were denatured by heating at 60°C for 10 min in buffer containing 30 mM 4-morpholinopropanesulfonic acid, 42% deionised formamide, and 8.5% formaldehyde. Thirty μg of RNA species were then separated by electrophoresis through a denaturing 1% agarose-1.7% formaldehyde gel submerged in 20 mM 4-morpholinopropanesulfonic acid, 8 mM sodium acetate and 1mM EDTA buffer, pH 7.2. Isolated RNA was transferred to a nylon membrane (Qiabrane, Qiagen) by capillary blotting with a solution of 1.2 M NaCl and 0.15 M sodium citrate, pH 7.0. RNA was fixed to the membrane by exposure to UV light. Membranes were

prehybridised for 2 hours at 52°C with 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ denatured salmon sperm DNA, 1% dextran sulfate, 1 % bovine serum albumin, 1mM EDTA, 7% SDS, and 0.5 M NaPO_4 (pH 7.2). The cDNA probes (rabbit CYP1A1, 1A2, 3A6 and rat 18S) were labelled with $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (3000 Ci mmol^{-1} ; Amersham Pharmacia Biotech) using Klenow fragment according to the oligo-priming method of the Oligolabelling kit (Amersham Pharmacia Biotech). Hybridisation was performed at 52°C for 24 h with the radiolabelled cDNA probe in the prehybridisation buffer. Blots were washed at 65°C for 10 min with a solution containing 3 M NaCl, 0.2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 0.02 M EDTA, pH 7.4 and 0.1% SDS. Membranes were exposed to an autoradiography film Biomax by means of Biomax TranScreen-HE intensifying screens (Kodak) at -80°C during 24 h. The intensities of the bands were measured with the software Un-Scan-It-Gel (Silk Scientific Inc., Orem, Utah) and are represented in arbitrary units. The assay is linear in the range of protein amounts assessed under the present experimental conditions.

There are two forms of CYP3A6 mRNA expressed in the liver, one with 1.85-kb and the other with 1.7-kb. Even if these forms differ by the length of their 3' untranslated region, they originate the same protein (Dalet *et al.*, 1988). Both forms can be separated and quantified simultaneously.

Immuno-neutralisation of cytokines

The selection of the antibodies used for the immuno-neutralisation of cytokines was based a) upon the M_r of the proteins incorporated in the HPLC fractions having the ability to change P450 content and activity, and b) according to the kind of cytokines hypoxia releases (Naldini *et al.*, 1997). To prevent the changes in P450 content and

activity induced by the HPLC fractions, the following antibodies were used: a goat anti-rabbit IL-1 β (anti-IL-1 β) polyclonal antibody, and an anti-human IL-2 (anti-IL2), an anti-human IFN- γ (anti-IFN- γ), an anti-human IL-6 (anti-IL-6), and an anti-human Epo (anti-Epo) monoclonal antibodies. The antibodies against human proteins were used to neutralise the homologous rabbit proteins because of the known inter-species reactivity of these antibodies (Huang *et al.*, 1997; Muscettola *et al.*, 1995). An irrelevant monoclonal antibody (IgG to *Pseudomona aeruginosa*) served as control. Aliquots of 2 μ g of each antibody were added individually to 200 μ l of the HPLC fractions having the ability to change P450 content and activity, and were incubated at 37°C for 1 h. The antibody and the HPLC fractions were added to the hepatocytes at the beginning of the 4 and 24 h periods of incubations and activity and content of P450 was assessed. The amount of antibodies used, e.g. 2 μ g, was selected because it was proven that 2 μ g were effective to immuno-neutralise IL-1 β , IL-6, and IFN- γ in the sera of rabbits and of humans with an inflammatory reaction (Bleau *et al.*, 2000). In the present study, 2 and 4 μ g of anti-IL-6 antibody were used.

Drugs and Chemicals

Percoll gradient, William's medium E, calf serum, type I rat tail collagen, NaCl, KCl, KH₂PO₄, Hepes, EGTA, glucose, theophylline, 3MX, 1MU and 1,3DMU were purchased from Sigma Chemicals (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.). DFB and DFH were provided by Merck Frosst Canada (Kirkland, Québec, Canada). Insulin was acquired from Boehringer Mannheim Biochemica (Mannheim, Germany), and L-glutamic dehydrogenase, aldolase triosephosphate isomerase, trypsin inhibitor, cytochrome c, and aprotinin from Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC, Canada). The polyclonal anti-

rabbit CYP1A1 and the monoclonal anti-rat CYP3A1 antibodies were purchased from Oxford Biochemical Research (Oxford, MI, U.S.A.), the anti-IL-1 β antibody from Cedar Lane (Hornby, ON, Canada), the anti-IL-2, anti-IL-6, and anti-IFN- γ antibodies from R&D Systems (Minneapolis, MN, U.S.A.). Finally, anti-Epo antibody was purchased from Genzyme Diagnostics (Cambridge, MA, U.S.A.). Specific cDNA probes for rabbit CYP1A1, 1A2 and 3A6 were kindly provided by Prof. P. Maurel (INSERM U128, Montpellier, France) and rat 18S by Dr V. Pichette (Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Canada).

Statistical analysis

All results are presented as mean \pm s.e. The comparison of the results from the various experimental groups and their corresponding controls was carried out by a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Newman-Keuls *post hoc* test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Effect of hypoxia in vivo on hepatic P450 content, activity and amount of P450 isoforms.

Exposure of rabbits ($n = 7$) to an 8 % FiO_2 generated a stable hypoxemia, with an average PaO_2 of 34.2 ± 1.3 mmHg, without influencing the PaCO_2 ($\approx 20.7 \pm 1.0$) and arterial pH (7.47 ± 0.05). Compared with H_{CONT} , 48 h of hypoxia *in vivo* reduced total P450 content by 45 % and decreased 3MX, 1MU and 1,3DMU output by 58, 42 and 33% ($p < 0.05$), respectively (Table 1).

Compared with rabbits ($n = 7$) breathing a 21% FiO_2 , e.g. room air, hypoxia reduced the amount of CYP1A1 and 1A2 proteins by 37 and 40%, respectively (Figure 1A). In parallel, *CYP1A1* and *1A2* mRNAs were decreased in animals exposed to 8% FiO_2 (Figure 2A). Forty-eight hours of hypoxia increased the amount of CYP3A6 by 70% (Figure 1A) as well as the two forms of *CYP3A6* mRNA (Figure 2A). This increase in CYP3A6 expression resulted in the enhancement of CYP3A6 activity, that is the formation of the fluorescent metabolite DFH was $\approx 76\%$ higher ($p < 0.05$) in H_{HYPO} than in H_{CONT} , e.g. 11627 ± 288 and 6606 ± 245 .

Effect of S_{CONT} and serum of rabbits with hypoxia (S_{HYPO}) on H_{CONT} following 4 and 24 h of incubation.

Incubation for 4 h of H_{CONT} with S_{CONT} ($n = 7$) and S_{HYPO} ($n = 7$) did not modify P450 content, theophylline biotransformation (Table 1) or the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 proteins (data not shown).

Compared with H_{CONT} incubated with S_{CONT} , 24 h of incubation of H_{CONT} with S_{HYPO} ($n = 7$), reduced the output of 3MX, 1MU and 1,3DMU by 26, 31 and 21% ($p < 0.05$), respectively, increased the amount of CYP3A6 by 28% (data not shown) and the formation of DFH by 29% ($p < 0.05$) e.g. 4842 ± 191 for S_{CONT} and 6246 ± 202 for S_{HYPO} . No changes in P450 content (Table 1) or amount of CYP1A1, 1A2 proteins (data not shown) were observed. However, S_{HYPO} diminished the amount of *CYP1A1* mRNA by 20%, e.g. 0.531 ± 0.027 with S_{CONT} and 0.425 ± 0.014 with S_{HYPO} , and that of *CYP1A2* mRNA by 24%, e.g. 0.424 ± 0.041 with S_{CONT} and 0.322 ± 0.014 with S_{HYPO} . On the other hand, S_{HYPO} increased the amount of *CYP3A6* mRNA by 49%, e.g. 0.120 ± 0.020 with S_{CONT} and 0.179 ± 0.006 with S_{HYPO} ($p < 0.05$, $n = 4$; Figure 2B).

Effect of S_{CONT} and S_{HYPO} on H_{HYPO} following 4 and 24 h of incubation.

Compared with S_{CONT} ($n = 18$), 4 h of incubation of S_{HYPO} ($n = 18$) with H_{HYPO} did not modify P450 content or amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 proteins. However, S_{HYPO} reduced the output of 3MX, 1MU and 1,3DMU by 31, 29 and 37%, respectively ($p < 0.05$) (Table 2).

Following 24 h incubation, S_{HYPO} ($n = 18$) did not affect P450 content in H_{HYPO} , but reduced the output of 3MX, 1MU and 1,3DMU ($p < 0.05$) (Table 2). In addition, S_{HYPO} reduced the amount of CYP1A1 and 1A2 proteins by an average of 25 and 28%, respectively ($p < 0.05$), and increased the expression of CYP3A6 by an average of 43% ($p < 0.05$) (Figure 1B). However, S_{HYPO} did not diminish the amounts of *CYP1A1* and *1A2* mRNA, but increased the amount of *CYP3A6* mRNA by 59%, e.g. 0.358 ± 0.045 with S_{CONT} and 0.570 ± 0.016 with S_{HYPO} ($p < 0.05$, $n = 4$; Figure 2C). The activity of

CYP3A6 was increased by 30% ($p < 0.05$) e.g. 8702 ± 299 with S_{CONT} and 11312 ± 268 with S_{HYPO} .

Effect of HPLC fractions of S_{HYPO} on P450 content, activity and isoforms of H_{HYPO} following 4 and 24 h of incubation.

Serum fractions of S_{CONT} when incubated for 4 h with H_{CONT} did not modify the amount and activity of total P450 (data not shown). Incubation of the HPLC fractions of S_{HYPO} ($n = 12$) with H_{HYPO} for 4 h did not modify P450 content. However, the amount of theophylline metabolites generated by H_{HYPO} was decreased by the fractions containing proteins with a M_r of 15-23 kDa and of 65-94 kDa (Figure 3), despite that these two fractions did not affect the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 proteins.

The serum fractions of S_{CONT} incubated for 24 h with H_{CONT} did not modify the expression and activity of CYP1A1, 1A2 and 3A6 (data not shown). Incubation of the HPLC fractions of S_{HYPO} ($n = 12$) with H_{HYPO} for 24 h shows that the 15-23 kDa fraction decreased P450 content by 38% ($p < 0.05$), while the 32-44 kDa fraction increased P450 content by 33% ($p < 0.05$) (Figure 4). The 15-23 kDa and 65-94 kDa HPLC fractions reduced the output of 3MX, 1MU and 1,3DMU ($p < 0.05$) (Figure 5). In addition, the 15-23 kDa fraction ($n = 7$) reduced the amount of CYP1A1 and 1A2 proteins by 42 and 30%, respectively ($p < 0.05$), and the amount of CYP3A6 by 21% (Figure 6). On the other hand, the amount of CYP3A6 protein was increased by 51% ($p < 0.05$) by the 32-44 kDa fraction ($n = 7$) (Figure 6).

Identification of the mediators in S_{HYPO} responsible for the changes in the amount and activity of P450.

Compared with the biotransformation of theophylline by H_{HYPO} in presence of S_{CONT} , incubation of H_{HYPO} for 4 h with the 15-23 kDa and 65-94 kDa fractions of S_{HYPO} in presence anti-IFN- γ antibody ($n = 6$), completely abrogated the decrease of theophylline metabolism elicited by these fractions (Figure 7). On the other hand, anti-IL-1 β and anti-IL-2 antibodies ($n = 6$) only partially reverted the decrease in theophylline metabolism elicited by the 15-23 kDa and 65-94 kDa fractions. The presence of anti-IL-6 antibody ($n = 6$) did not prevent the effect of these two HPLC fractions on the output of 3MX, 1MU and 1,3DMU (Figure 7).

Following 24 h incubation of H_{HYPO} with the 15-23 kDa fraction of S_{HYPO} , P450 content was reduced by 38% ($n = 12$), and the addition of anti-IL-2, anti-IL-1 β and anti-IFN- γ antibodies ($n = 6$) to the 15-23 kDa fraction incremented P450 content to 84, 80 and 92% of control values, respectively ($p < 0.05$) (Figure 8). Anti-IFN- γ , -IL-1 β , -IL-2 and -IL-6 antibodies added to the 15-23 kDa and 65-94 kDa fractions elicited a variable effect on the output of 3MX, 1MU and 1,3DMU (Figure 9). Anti-IFN- γ antibody ($n = 6$) prevented the effect of the two HPLC fractions, whereas anti-IL-2 ($n = 6$) and anti-IL-1 β antibodies ($n = 6$) only partially, and anti-IL-6 antibody ($n = 6$) did not elicit any effect, despite that the amount of antibody was increased to 4 μ g. The addition of anti-IL-2, anti-IL-1 β and anti-IFN- γ antibodies ($n = 6$) to the 15-23 kDa fraction augmented the amount of CYP1A1 protein to 84, 80 and 90% of control values; only anti-IFN- γ antibody ($n = 6$) increased CYP1A2 protein to 89% of control values (Figure 10).

The 32-44 kDa fraction of S_{HYP0} ($n = 12$) increased P450 content by 33% ($p < 0.05$) after 24 h of incubation with H_{HYP0} . The addition of anti-Epo antibody ($n = 6$) to the 32-44 kDa fraction reduced the increase in P450 content ($p < 0.05$), however was unable to normalize it, e.g. it was still 14% greater than control ($p < 0.05$) (Figure 8). On the other hand, compared to the effect of the 32-44 kDa fraction on CYP3A6 (50% increase), the addition of anti-Epo antibody ($n = 6$) to the 32-44 kDa fraction reduced the increase in amount of CYP3A6 protein to 25% (Figure 10).

Discussion

In the liver, cytochrome P450 is located primarily in zone 3 or perivenous zone, where under control conditions the concentration of oxygen is the lowest (Oinonen & Lindros, 1998; Jungermann & Kietzmann, 2000). From zone 1 or periportal to the perivenous zone, the concentration of the signal oxygen falls from about 13 (arterial) to 9 (mixed periportal) and then to 4 (hepatic venous) volume % gas atmosphere (Jungermann & Kietzmann, 1997). Acute moderate hypoxia depresses enzymatic activity in both periportal, such as phosphoenolpyruvate carboxykinase (Jungermann & Kietzmann, 2000) and glutathione peroxidase (Proulx & du Souich, 1995), and perivenous zone, such as CYP1A1 and 1A2 and glucuronoconjugation (Jones, 1981). This is consistent with the fact that acute anoxia produces injuries which can be more extensive in the periportal zone than in the perivenous zone (Brass *et al.*, 1992). Cultured hepatocytes harvested from the entire liver without taking into account zonation should not distort the observations but could dilute the effect of hypoxia on CYP1A1, 1A2 and 3A6.

The present study demonstrates that *in vivo*, acute moderate hypoxia reduces total P450 content and activity, as well as the expression of CYP1A1 and CYP1A2, and up-regulates the expression and activity of CYP3A6. Incubation of S_{HYP}O with H_{HYP}O for 4 h diminishes the formation of theophylline metabolites without affecting total P450 content or amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 proteins. Moreover, incubation of S_{HYP}O with H_{HYP}O for 24 h reduces theophylline metabolites output, as well as the expression of CYP1A1 and 1A2, but increases that of CYP3A6 and its activity. On the other hand, incubation of S_{HYP}O with H_{CONT} for 4 h does not affect any of the parameters estimated,

but after 24 h, reduces the output of theophylline metabolites and increases the activity of CYP3A6. These results indicate that 1) incubation of S_{HYPO} with H_{HYPO} for 24 h portrays the effect of hypoxia *in vivo*, supporting that S_{HYPO} does contain serum mediators, 2) 4 h incubations demonstrate that the down-regulation of CYP1A1 and 1A2 is preceded by a decrease in their activity, and 3) the effect of hypoxia *in vivo* is not recreated by incubating S_{HYPO} with H_{CONT} , suggesting that *in vivo* the effect of hypoxia results from an increase in circulating serum mediators and from changes in the hepatocyte.

The HPLC fractions with proteins of 15-23 kDa and 65-94 kDa M_r down-regulate CYP1A1, 1A2 and 3A6; although, in both fractions, the mediators contributing to the decrease in the expression of these isoforms are IFN- γ , IL-1 β and IL-2. The efficiency and specificity of these cytokines to down-regulate CYP1A1, 1A2 and 3A6 differ. IFN- γ is not only the most potent, but also the only to down-regulate CYP1A2 and CYP3A6, whereas CYP1A1 is down-regulated by all three cytokines. These differences in efficiency and specificity explain why anti-IFN- γ antibody prevents the decrease in theophylline biotransformation, since theophylline is primarily metabolised by CYP1A2. IL-1 β and IL-2 diminish theophylline metabolism because they reduce the expression of CYP1A1. Actually, individual antibodies do not prevent totally the down-regulation of CYP1A1, 1A2 and 3A6, suggesting that the effect of the serum mediators results from concerted action and/or cross-talk of several cytokines. Further supporting a concerted action of several cytokines is the fact that *in vitro* experiments where individual cytokines are incubated with hepatocytes from normal animals or humans, show that IL-1 β has the greatest ability to depress CYP1A1 and 1A2 isoforms (Abdel-

Razzak *et al.*, 1993), and that IL-2 and IL-1 β depress CYP3A isoforms (Calleja *et al.*, 1998). These results differ from ours and may be explained by the presence of several mediators in the serum, by differences in the concentrations of the mediators, and by differences in the experimental model, e.g. control hepatocytes or hepatocytes from animals subjected to the hypoxic stress.

The fact that anti-IFN- γ , -IL-1 β and -IL-2 antibodies prevented the effect of the 65-94 kDa fraction on P450 may be explained by the binding of these cytokines to plasma proteins. Effectively, IFN- γ binds to soluble receptors with M_r ranging from 45 to 67 kDa (Bello *et al.*, 1998); IL-1 β circulates in plasma bound to the IL-1 receptor accessory protein with a M_r of approximately 66 kDa (Greenfeder *et al.*, 1995); and IL-2 can bind to a soluble receptor with a M_r of 67 kDa (Jacques *et al.*, 1990). Moreover, in the case of IFN- γ , selected activities are elicited by the tetramer of 72 kDa (Langer *et al.*, 1994).

Several mechanisms may have contributed to down-regulate CYP1A1 and 1A2 under hypoxic conditions. On one hand, the fact that the expression of CYP1A1/1A2 apoproteins and mRNAs decreased, supports the possibility that the effect of IFN- γ , IL-1 β and IL-2 implicates a pre-translational mechanism (Morgan, 1997). On the other hand, hypoxia modifies the expression of multiple genes to improve blood delivery and cellular metabolism (Bunn & Poyton, 1996), effect in part regulated by hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activator (HIF-1) (Semenza, 1999). HIF-1 is a basic heterodimer, with a HIF-1 α subunit, unique to HIF-1, and a HIF-1 β or aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) subunit. HIF-1 β /Arnt dimerises also with the aryl

hydrocarbon receptor (AhR) (Park, 1999). Under hypoxic conditions, HIF-1 β dimerises preferentially with HIF-1 α , in such a way that less HIF-1 β is available for recruitment with AhR as a heterodimeric partner. Since in adult rabbits, AhR is constitutively activated, and CYP1A1 and CYP1A2 genes are expressed constitutively (Strom *et al.*, 1992), we may speculate that activation of HIF-1 by hypoxia and by S_{HYP}O reduces AhR/Arnt heterodimer and CYP1A expression (Park, 1999). This explanation may apply to H_{CONT} where S_{HYP}O decreased *CYP1A1* and *1A2* mRNA. However, S_{HYP}O did not reduce *CYP1A1* and *1A2* mRNA further in H_{HYP}O, suggesting that the decrease in CYP1A1 and 1A2 proteins is secondary to a post-transcriptional effect. The reason why S_{HYP}O reduced *CYP1A1* and *1A2* mRNA in H_{CONT} but not in H_{HYP}O remains unknown.

It is not clear how S_{HYP}O reduces the activity of CYP1A1/1A2 without affecting their amount in H_{CONT} after 4 and 24 h of incubation, and in H_{HYP}O after 4 h of incubation. We may postulate that the decrease in activity is associated with the presence of reactive oxygen intermediates (ROI). Hypoxia induces a time-dependent decrease in reduced glutathione and other cellular antioxidants, and an increase in lipid peroxidation in the liver (Proulx & du Souich, 1995), probably as a result of the formation hydrogen peroxide (H₂O₂) (Weissmann *et al.*, 2000) and nitric oxide (NO^{*}) (Gess *et al.*, 1997). There is evidence that H₂O₂ and NO^{*} can inactivate P450 apoproteins (Karuzina & Archakov, 1994; Takemura *et al.*, 1999). Indirect evidence supporting a role for ROI in P450 decrease in activity, is the fact that L-NAME, N-acetylcysteine and dimethylthiourea dose-dependently prevent the decrease in CYP1A1/1A2 activity induced by IL-6, INF- γ and IL-1 β (El-Kadi *et al.*, 2000).

Hypoxia *in vivo* and incubation of S_{HYPO} with H_{HYPO} *in vitro* increase the expression of CYP3A6 and *CYP3A6* mRNA. The expression of CYP3A4 is modulated by nuclear receptors, such as constitutive androstane receptor (CAR), pregnane X receptor (PXR), retinoid X receptor (RXR), hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4), and glucocorticoid receptor (GR) (El-Sankary *et al.*, 2000). Assuming that CYP3A6 is modulated as CYP3A4, since hypoxia activates HIF-1 in cooperation with HNF-4, RXR, and GR (Bunn *et al.*, 1998; Machein *et al.*, 1999; Kambe *et al.*, 2000), we may speculate that these proteins are implicated in the increase in *CYP3A6* gene and CYP3A6 apoprotein. The increase in expression of CYP3A6 by the 32-44 kDa fraction is partially reversed by anti-Epo antibodies. There is no data supporting that Epo modulates directly the expression of CYP3A. On the other hand, Epo binding to its membrane receptor activates phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) (Gaffen *et al.*, 1999; Lacombe & Mayeux, 1999), which is required for HIF-1 stabilization and translocation (Mazure *et al.*, 1997). We postulate that Epo facilitates HIF-1 cooperation with nuclear receptors to enhance CYP3A6 expression.

S_{HYPO} does not increase CYP3A6 in H_{CONT} , suggesting that the presence of serum mediators is not enough to up-regulate CYP3A6, hypoxia must prime the hepatocyte to be responsive to S_{HYPO} . Several mechanisms, not mutually exclusive, are plausible to prime the hepatocyte: a) hypoxia increases the expression of the nuclear factors RXR, HNF-4, and GR (Machein *et al.*, 1999; Kambe *et al.*, 2000); b) hypoxia modulates protein tyrosine kinase (Uchiyama *et al.*, 2000), AMP-activated protein kinase (Blazquez *et al.*, 1999), and protein kinase C (Hsu & Huang, 1998) activities, known to regulate the expression of CYP3A (Brown *et al.*, 1997); c) hypoxia activates PI-3K

required for HIF-1 stabilization and translocation (Mazure *et al.*, 1997); and d) hypoxia increases plasma levels of cytokines which enhance the density of cytokines surface receptors (Simms & D'Amico, 1996; Takabatake *et al.*, 2000). Any of these mechanisms could contribute to increase responsiveness of H_{HYP0} by comparison with H_{CONT} .

In conclusion, the present study demonstrates that acute moderate hypoxia modifies the expression of hepatic P450 isoforms by several mechanisms, including serum mediators and intracellular adaptation to hypoxia. Hypoxia induces the release of serum mediators, among them IFN- γ , IL-1 β and IL-2, that reduce initially the activity and thereafter decrease the expression of CYP1A1 and 1A2 and of *CYP1A1* and *1A2* genes. In addition, acute moderate hypoxia increases the expression of CYP3A6 protein and *CYP3A6* gene, effect partially mediated by circulating Epo. The pathophysiological role of CYP3A6 induction is unknown. Intracellular adaptation to hypoxia is evidenced by the fact that the combined effect of all these mediators reproduce the effects observed *in vivo* when they are incubated with H_{HYP0} but not with H_{CONT} .

Acknowledgments

Supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP - 43925).

The technical assistance of Mrs Lucie Héroux is gratefully acknowledged. We are grateful to Dr. François Leblond for his assistance in the measure of CYP mRNA.

References

- ABDEL-RAZZAK, Z., LOYER, P., FAUTREL, A., GAUTIER, J.C., CORCOS, L., TURLIN, B., BEAUNE, P. & GUILLOUZO, A. (1993) Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol. Pharmacol.* **44**, 707-715.
- BELLO, I., PEREZ, A., TORRES, A.M., HERNANDEZ, M.V. & LOPEZ SAURA, P. (1998) High levels of soluble IFN gamma receptor alpha chain in the plasma of rheumatoid arthritis patients. *Biotherapy* **11**, 53-57.
- BLAZQUEZ, C., WOODS, A., DE CEBALLOS, M.L., CARLING, D. & GUZMAN, M. (1999) The AMP-activated protein kinase is involved in the regulation of ketone body production by astrocytes. *J. Neurochem.* **73**, 1674-1682.
- BLEAU, A.M., LEVITCHI, M., MAURICE, H. & DU SOUICH, P. (2000) Different cytokines mediate in vivo the human viral- and the rabbit turpentine-induced inflammation inactivation of hepatic cytochrome P450. *Br. J. Pharmacol.* **130**, 1777-1784.
- BRASS, C.A., CRAWFORD, J.M., NARCISO, J. & GOLLAN, J.L. (1992) Hypoxic liver injury and the ameliorating effects of fructose: the "glucose paradox" revisited. *Am. J. Physiol.* **263**, G293-300.
- BROWN, S.E., QUATTROCHI, L.C. & GUZELIAN, P.S. (1997) Characterization of a pretranscriptional pathway for induction by phenobarbital of cytochrome P450 3A23 in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **342**, 134-142.
- BUNN, H.F., GU, J., HUANG, L.E., PARK, J.W. & ZHU, H. (1998) Erythropoietin: a model system for studying oxygen-dependent gene regulation. *J. Exp. Biol.* **201**, 1197-1201.
- BUNN, H.F. & POYTON, R.O. (1996) Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol. Rev.* **76**, 839-885.
- CALLEJA, C., EECKHOUTTE, C., LARRIEU, G., DUPUY, J., PINEAU, T. & GALTIER, P. (1997) Differential effects of interleukin-1 beta, interleukin-2, and interferon-gamma on the inducible expression of CYP1A1 and 1A2 in cultured rabbit hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **239**, 273-278.

- CALLEJA, C., EECKHOUTTE, C., DACASTO, M., LARRIEU, G., DUPUY, J., PINEAU, T. & GALTIER, P. (1998) Comparative effects of cytokines on constitutive and inducible expression of the gene encoding for the cytochrome P450 3A6 isoenzyme in cultures rabbit hepatocytes: consequences on progesterone 6 β -hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.* **56**, 1279-1285.
- CHAURET, N., TREMBLAY, N., LACKMAN, R.L., GAUTHIER, J.Y., SILVA, J.S., MAROIS, J., YERGEY J.A., & NICOLL-GRIFFITH, D.A., (1999), Description of a 96-well plate assay to measure P4503A inhibition in human liver microsomes using a selective fluorescent probe. *Analytic. Biochemistry*, **276**, 215-225.
- DALET, C., CLAIR, P., DAUJAT, M., FORT, P., BLANCHARD, J.M. & MAUREL, P. (1988) Complete sequence of cytochrome P450 3c cDNA and presence of two mRNA species with 3' untranslated regions of different length. *DNA* **7**:39-46.
- EL-KADI, A.O., BLEAU, A.M., DUMONT, I., MAURICE, H. & DU SOUICH P. (2000) Role of reactive oxygen intermediates in the decrease of hepatic cytochrome P450 activity by serum of humans and rabbits with an acute inflammatory reaction. *Drug Metab. Dispos.* **28**, 1112-1120.
- EL-KADI, A.O.S., MAURICE, H., ONG, H. & DU SOUICH, P. (1997) Down regulation of the hepatic cytochrome P450 by an acute inflammatory reaction: implication of human and animal serum, and intrahepatic mediators. *Br. J. Pharmacol.* **121**, 1164-1170.
- EL-SANKARY, W., PLANT, N.J., GIBSON, G.G. & MOORE, D.J. (2000) Regulation of the CYP3A4 gene by hydrocortisone and xenobiotics: role of the glucocorticoid and pregnane X receptors. *Drug. Metab. Dispos.* **28**, 493-496.
- GAFFEN, S.L., LAI, S.Y., LONGMORE, G.D., LIU, K.D. & GOLDSMITH, M.A. (1999) Genetic evidence for an additional factor required for erythropoietin-induced signal transduction. *Blood* **94**, 74-86.
- GEISS, B., SCHRICKER, K., PFEIFER, M. & KURTZ, A. (1997) Acute hypoxia upregulates NOS gene expression in rats. *Am. J. Physiol.* **273**, R905-R910.

- GREENFEDER, S.A., NUNES, P., KWEE, L., LABOW, M., CHIZZONITE, R.A. & JU, G. (1995) Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J. Biol. Chem.* **270**, 13757-13765.
- HSU, K.S. & HUANG, C.C. (1998) Protein kinase C inhibitors block generation of anoxia-induced long-term potentiation. *Neuroreport* **9**, 3525-3529.
- HUANG, W.T., LIN, M.T. & WONG, S.J. (1997) Staphylococcal enterotoxin A-induced fever is associated with increased circulating levels of cytokines in rabbits. *Inf. Immunol.* **65**, 2656-2662.
- JACQUES, Y., LE MAUFF, B., GODARD, A., NAULET, J., CONCINO, M., MARSH, H., IP, S. & SOULILLOU, J.P. (1990) Biochemical study of a recombinant soluble interleukin-2 receptor. Evidence for a homodimeric structure. *J. Biol. Chem.* **265**, 20252-20258.
- JONES, D.P. (1981) Hypoxia and drug metabolism. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 1019-1023.
- JUNGERMANN, K. & KIETZMANN, T. (1997) Role of oxygen in the zonation of carbohydrate metabolism and gene expression in liver. *Kidney Int.* **51**, 402-412.
- JUNGERMANN, K. & KIETZMANN, T. (2000) Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver. *Hepatology* **31**, 255-260.
- KAMBE, T., TADA-KAMBE, J., KUGE, Y., YAMAGUCHI-IWAI, Y., NAGAO, M. & SASAKI, R. (2000) Retinoic acid stimulates erythropoietin gene transcription in embryonal carcinoma cells through the direct repeat of a steroid/thyroid hormone receptor response element half-site in the hypoxia-response enhancer. *Blood* **96**, 3265-3271.
- KARUZINA, I.I. & ARCHAKOV, A.I. (1994) The oxidative inactivation of cytochrome P450 in monooxygenase reaction. *Free. Rad. Biol. Med.* **16**, 73-97.
- KRUGER, N.J. (1994) Detection of polypeptides on immunoblots using secondary antibodies or protein A. In *Methods of molecular biology*. ed. Walker J.M. Vol. 32, pp. 215-226. Totowa, N.J. Humana Press.
- KURDI, J., MAURICE, H., EL-KADI, A.O.S., ONG, H., DALKARA, S., BÉLANGER, P.M. & DU SOUICH, P. (1999) Effect of hypoxia alone or combined with inflammation and 3-methylcholanthrene on hepatic cytochrome P450 in conscious rabbits. *Br. J. Pharmacol.* **128**, 365-373.

- LACOMBE, C. & MAYEUX, P. (1999) The molecular biology of erythropoietin. *Nephrol. Dial. Transplant.* **14** (Suppl 2), 22-28.
- LANGER, J.A., RASHIDBAIGI, A., GAROTTA, G. & KEMPNER, E. (1994) Radiation inactivation of human gamma-interferon: cellular activation requires two dimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 5818-5822.
- LEBLOND, F., GUEVIN, C., DEMERS, C., PELLERIN, I., GASCON-BARRE, M. & PICHETTE, V. (2001) Down-regulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 326-332.
- LETARTE, L. & DU SOUICH, P. (1984) Influence of hypercapnia and/or hypoxemia and metabolic acidosis on theophylline kinetics in the conscious rabbit. *Am. Rev. Respir. Dis.* **129**, 762-766
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- MACHEIN, M.R., KULLMER, J., RONICKE, V., MACHEIN, U., KRIEG, M., DAMERT, A., BREIER, G., RISAU, W. & PLATE, K.H. (1999) Differential downregulation of vascular endothelial growth factor by dexamethasone in normoxic and hypoxic rat glioma cells. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **25**, 104-112.
- MAZURE, N.M., CHEN, E.Y., LADEROUTE, K.R. & GIACCIA, A.J. (1997) Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. *Blood* **90**, 3322-3331.
- MORGAN, E.T. (1997) Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab. Rev.* **29**, 1129-1188.
- MUSCETTOLA, M., GIROLAMI, L., TANGANELLI, C., FONTANI, G. & LUPO, C. (1995) Immune and endocrine aspects of behaviour in male rabbits. *Neuroimmunomodulation* **2**, 155-160.
- NALDINI, A., CARRARO, F., SILVESTRI, S. & BOCCI, V. (1997) Hypoxia affects cytokines production and proliferative responses by human peripheral mononuclear cells. *J. Cell. Physiol.* **173**, 335-342.

- NG, C.Y., GHABRIAL, H., MORGAN, D.J., CHING, M.S., SMALLWOOD, R.A. & ANGUS, P.W. (2000) Impaired elimination of propranolol due to right heart failure: drug clearance in the isolated liver and its relationship to intrinsic metabolic capacity. *Drug Metab. Dispos.* **28**, 1217-1221.
- OMURA, T. & SATO, R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. 1. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* **239**, 2370-2378.
- OINONEN, T. & LINDROS, K.O. (1998) Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation. *Biochem. J.* **329**, 17-35.
- PARK, H. (1999) Aromatic hydrocarbon nuclear translocator as a common component for the hypoxi- and dioxin-induced gene expression. *Mol. Cells* **9**, 172-178.
- POWELL, J.R., VOZEH, S., HOPEWELL, P., COSTELLO, J., SCHEINER, L.B. & RIEGELMAN, S. (1978) Theophylline disposition in acutely ill hospitalized patients. The effect of smoking, heart failure, severe airway obstruction and pneumonia. *Am. Rev. Respir. Dis.* **118**, 229-238.
- PROULX, M. & DU SOUICH, P. (1995) Acute moderate hypoxia in conscious rabbits: effect on hepatic cytochrome P450 and on reactive species. *J. Pharm. Pharmacol.* **47**, 392-397.
- RICHER, M. & LAM, Y.W. (1993) Hypoxia, arterial pH and theophylline disposition. *Clin. Pharmacokinet.* **25**, 283-299.
- SEGLEN, P.O. (1976) Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell. Biol.* **13**, 29-83.
- SEMENZA, G.L. (1999) Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **15**, 551-578.
- SHAN, X., AW, T.Y., SMITH, E.R., INGELMAN-SUNDBERG, M., MANNERVIK, B., IYANAGI, T. & JONES, D.P. (1992) Effect of chronic hypoxia on detoxication enzymes in rat liver. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 2421-2426.
- SILVA J.M. & NICOLL-GRIFFITH D.A. (2001) *In vitro* models for studying induction of cytochromes P450 enzymes. In *Drug-drug Interactions*. ed. Rodrigues A.D. pp199-201, New York : Marcel Dekker.

- SIMMS, H. & D'AMICO, R. (1996) Regulation of polymorphonuclear leukocyte cytokine receptor expression: the role of altered oxygen tensions and matrix proteins. *J. Immunol.* **157**, 3605-3616.
- SMITH, B.J. (1994) SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In *Methods of molecular biology*. ed. Walker J.M. Vol. 32, pp. 23-34. Totowa, N.J. Humana Press.
- STROM, D.K., POSTLIND, H., TUKEY, R.H. (1992) Characterization of the rabbit CYP1A1 and CYP1A2 genes: developmental and dioxin-inducible expression of rabbit liver P450A1 and P450A2. *Arch. Biochem. Biophys.* **294**, 707-716.
- TAKABATAKE, N., NAKAMURA, H., ABE, S., INOUE, S., HINO, T., SAITO, H., YUKI, H., KATO, S. & TOMOIKE, H. (2000) The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor-alpha system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 1179-1184.
- TAKEMURA, S., MINAMIYAMA, Y., IMAOKA, S., FUNAE, Y., HIROHASHI, K., INOUE, M. & KINOSHITA, H. (1999) Hepatic cytochrome P450 is directly inactivated by nitric oxide, not by inflammatory cytokines, in the early phase of endotoxemia. *J. Hepatol.* **30**, 1035-1044.
- THORPE, G.H.G., KRICKA, L.J., MOSELEY, S.B. & WHITEHEAD, T.P. (1985) Phenols as enhancers of chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clin. Chem.* **31**, 1335-1341.
- UCHIYAMA, T., KURABAYASHI, M., OHYAMA, Y., UTSUGI, T., AKUZAWA, N., SATO, M., TOMONO, S., KAWAZU, S. & NAGAI, R. (2000) Hypoxia induces transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene through genistein-sensitive tyrosine kinase pathways in vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Bio.* **20**, 1155-1161.
- WEISSMANN, N., TADIC, A., HANZE, J., ROSE, F., WINTERHALDER, S., NOLLEN, M., SCHERMULY, R.T., GHOFrani, H.A., SEEGER, W. & GRIMMINGER, F. (2000) Hypoxic vasoconstriction in intact lungs: a role for NADPH oxidase-derived H₂O₂? *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **279**, L683-690.

Table 6.1 Effect of 48 h hypoxia *in vivo* and of the incubation of control hepatocytes with serum of control and hypoxic rabbits for 4 and 24 h on P450 content and metabolism of theophylline.

	Cytochrome P450 (nmol mg ⁻¹ protein)	3MX (μg ml ⁻¹)	1MU (μg ml ⁻¹)	1,3DMU (μg ml ⁻¹)
<u><i>In vivo</i> hypoxia</u>				
H _{CONT} + NaCl	0.330 ± 0.021	0.094 ± 0.011	0.140 ± 0.006	1.340 ± 0.116
H _{HYP} O + NaCl	0.181 ± 0.020*	0.039 ± 0.004*	0.081 ± 0.003*	0.901 ± 0.043*
<u>Incubation 4 h</u>				
H _{CONT} + S _{CONT}	0.361 ± 0.022	0.099 ± 0.010	0.120 ± 0.004	1.335 ± 0.201
H _{CONT} + S _{HYP} O	0.349 ± 0.020	0.091 ± 0.021	0.111 ± 0.013	1.195 ± 0.111
<u>Incubation 24 h</u>				
H _{CONT} + S _{CONT}	0.325 ± 0.031	0.222 ± 0.031	0.249 ± 0.019	4.268 ± 0.321
H _{CONT} + S _{HYP} O	0.330 ± 0.024	0.164 ± 0.022*	0.171 ± 0.015*	3.341 ± 0.303*

Data is presented as mean ± standard error. Hepatocytes from control (H_{CONT}) and rabbits with acute moderate hypoxia (H_{HYP}O) were incubated with NaCl 0.9% (n = 7) or with serum from control rabbits (S_{CONT}) (n = 7) and serum from rabbits with acute moderate hypoxia (S_{HYP}O) (n = 7) for 4 and 24 h. 3MX, 1MU and 1,3DMU are 3-methylxanthine, 1-methyluric acid and 1,3-dimethyluric acid, respectively. * p < 0.05 compared with control.

Table 6.2 Effect of incubation of hepatocytes from hypoxic rabbits with serum from control and hypoxic rabbits for 4 and 24 h on P450 content and metabolism of theophylline.

	Cytochrome P450 (nmol mg ⁻¹ protein)	3MX (μg ml ⁻¹)	1MU (μg ml ⁻¹)	1,3DMU (μg ml ⁻¹)
<u>4 h incubation</u>				
H _{HYP} O + S _{CONT}	0.16 ± 0.019	0.035 ± 0.003	0.085 ± 0.002	1.112 ± 0.036
H _{HYP} O + S _{HYP} O	0.15 ± 0.010	0.024 ± 0.001*	0.060 ± 0.004*	0.701 ± 0.015*
<u>24 h incubation</u>				
H _{HYP} O + S _{CONT}	0.12 ± 0.010	0.078 ± 0.005	0.090 ± 0.011	2.106 ± 0.165
H _{HYP} O + S _{HYP} O	0.11 ± 0.010	0.059 ± 0.003*	0.057 ± 0.007*	1.295 ± 0.120*

Data is presented as mean ± standard error. Hepatocytes from rabbits with acute moderate hypoxia (H_{HYP}O) were incubated with serum from control rabbits (S_{CONT}) (n = 18) and serum from rabbits with acute moderate hypoxia (S_{HYP}O) (n = 18) for 4 and 24 h. 3MX, 1MU and 1,3DMU are 3-methylxanthine, 1-methyluric acid and 1,3-dimethyluric acid, respectively. * p<0.05 compared with H_{HYP}O + S_{CONT}

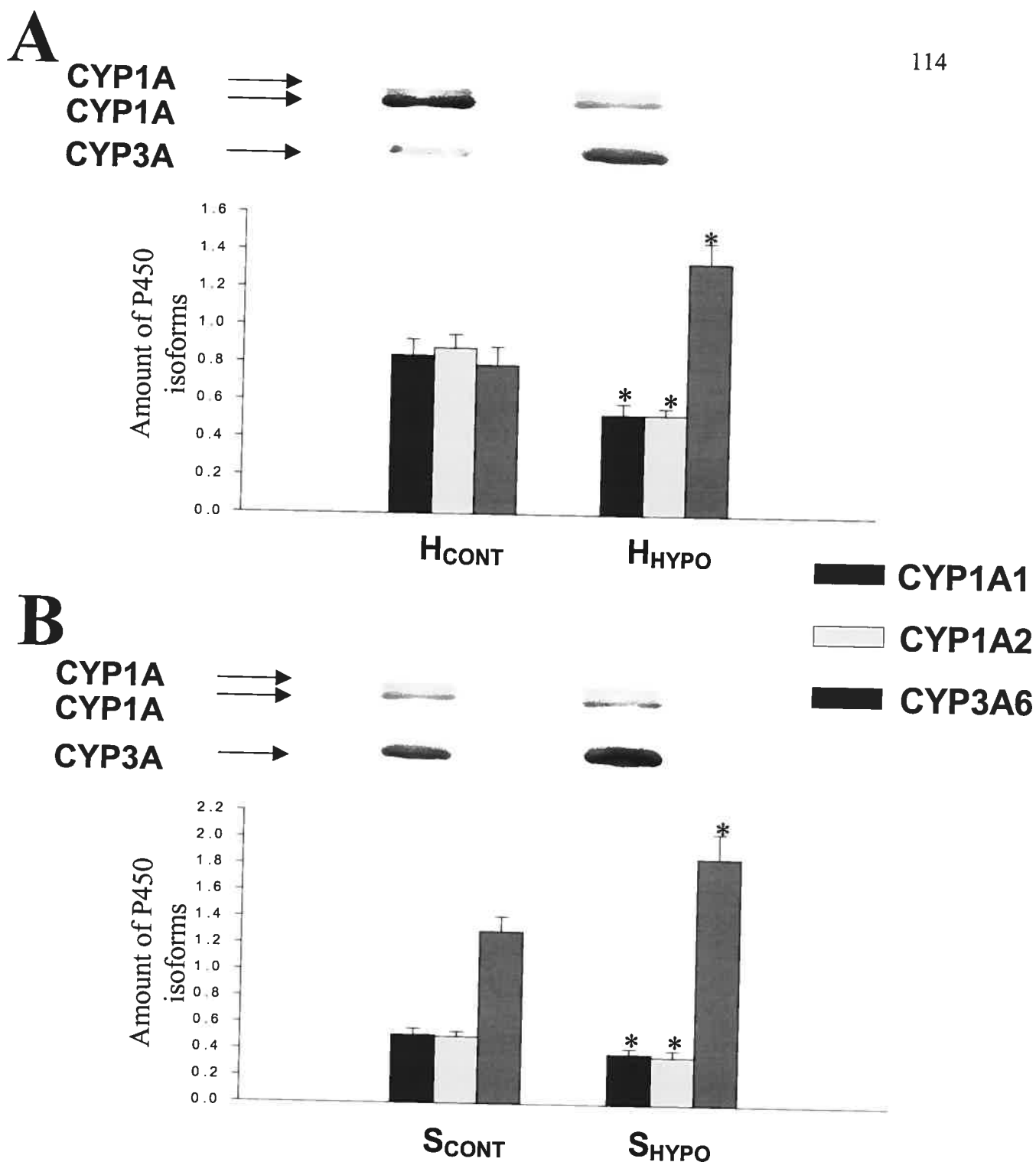


Figure 6.1 Effect (A) of 48 h acute moderate hypoxia *in vivo* on the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins in hepatocytes ($n = 7$), and (B) of serum from rabbits with acute moderate hypoxia (S_{HYPO}) ($n = 7$) on the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins incubated for 24 h with hepatocytes from rabbits with acute moderate hypoxia (H_{HYPO}). Right lane bands are representative Western blots of CYP1A1, 1A2 and 3A6. Data is presented in arbitrary units as mean \pm standard error. * $p < 0.05$ compared with control.

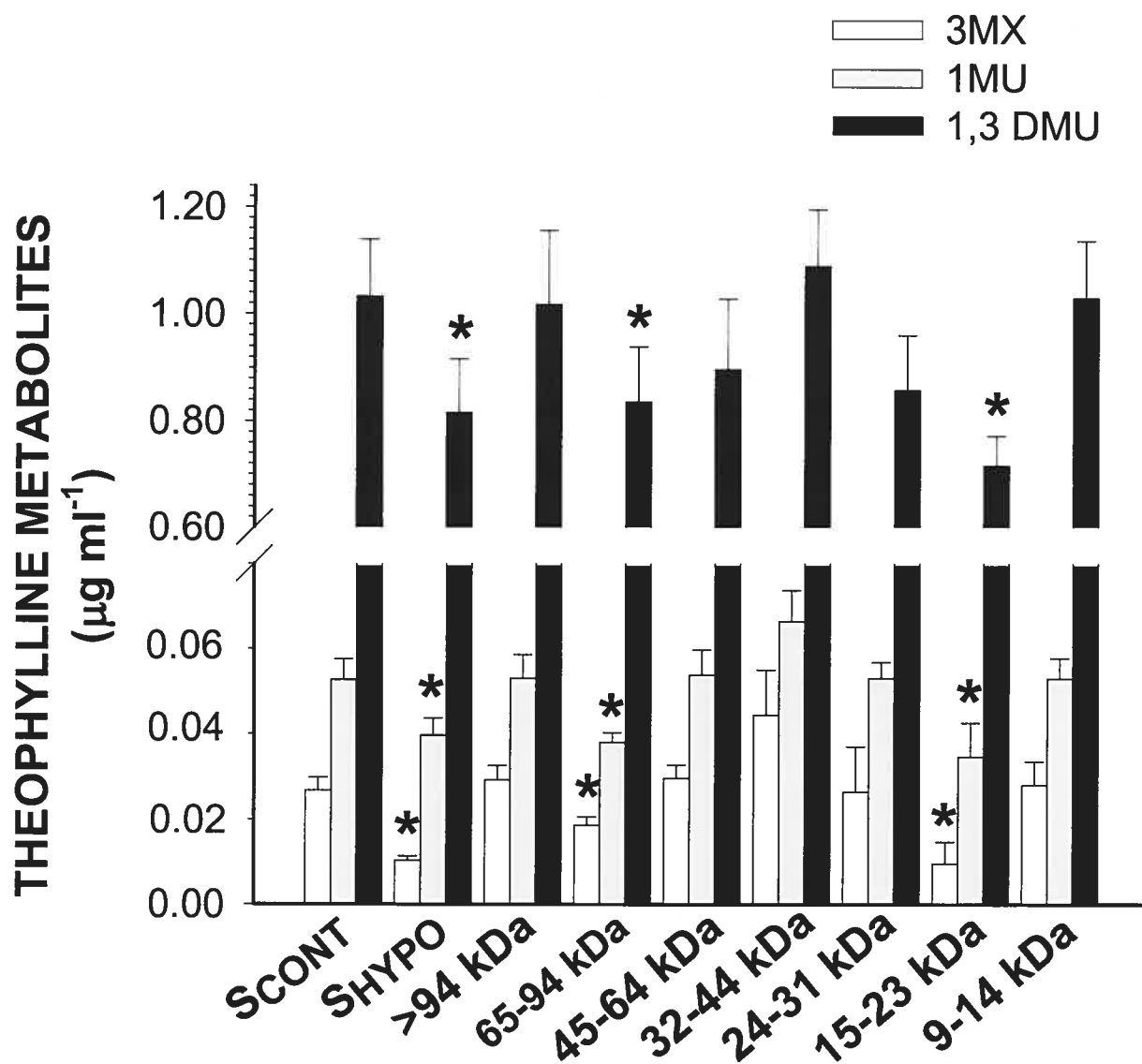


Figure 6.3 Effect of serum of control rabbits (S_{CONT}) ($n = 10$), serum from rabbits with acute moderate hypoxia (S_{HYPO}) ($n = 12$), and HPLC fractions of S_{HYPO} ($n = 12$) incubated for 4 h with hepatocytes from rabbits with acute moderate hypoxia on the formation of theophylline metabolites. Data is presented as mean \pm standard error. * $p < 0.05$ compared with S_{CONT} .

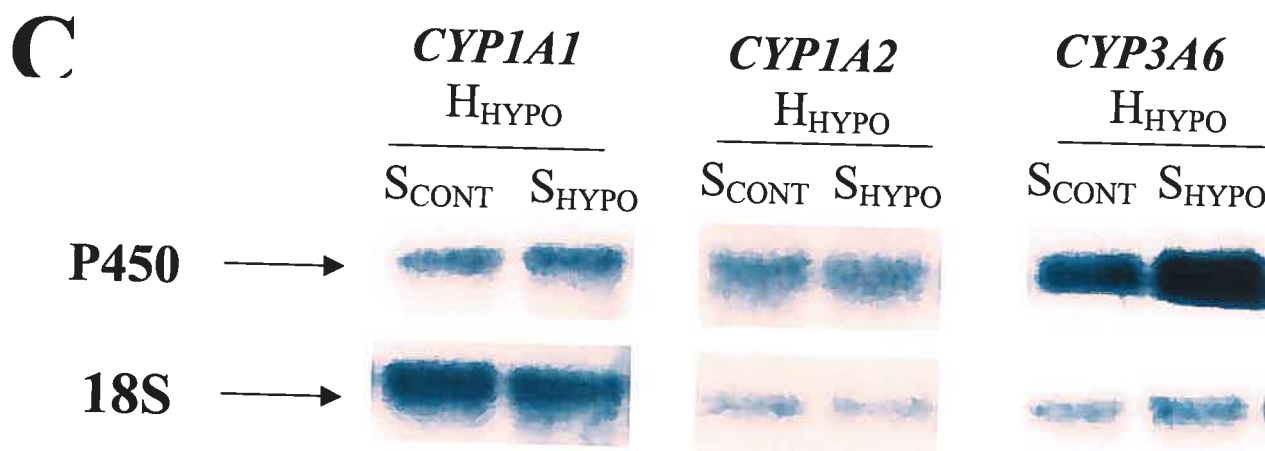
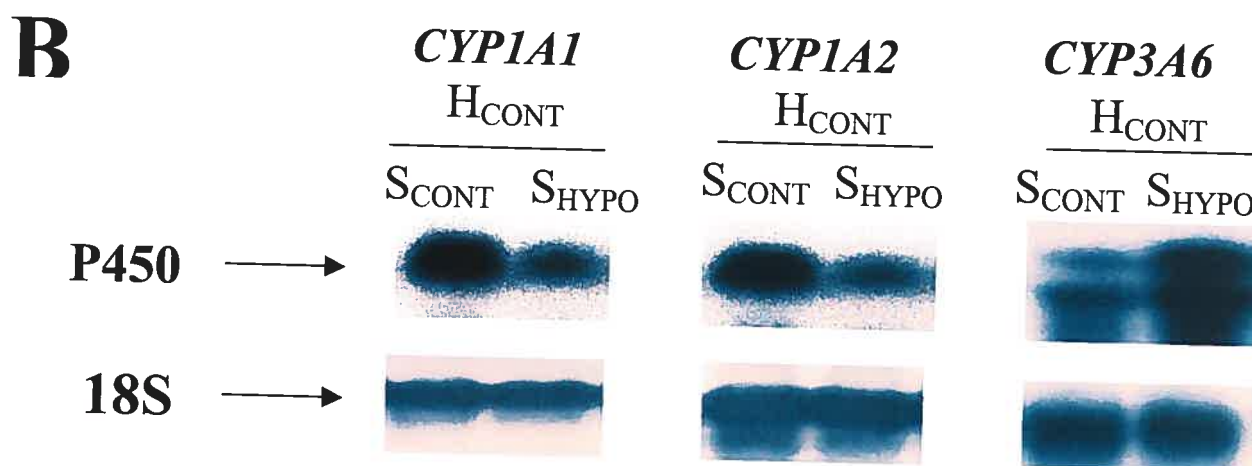
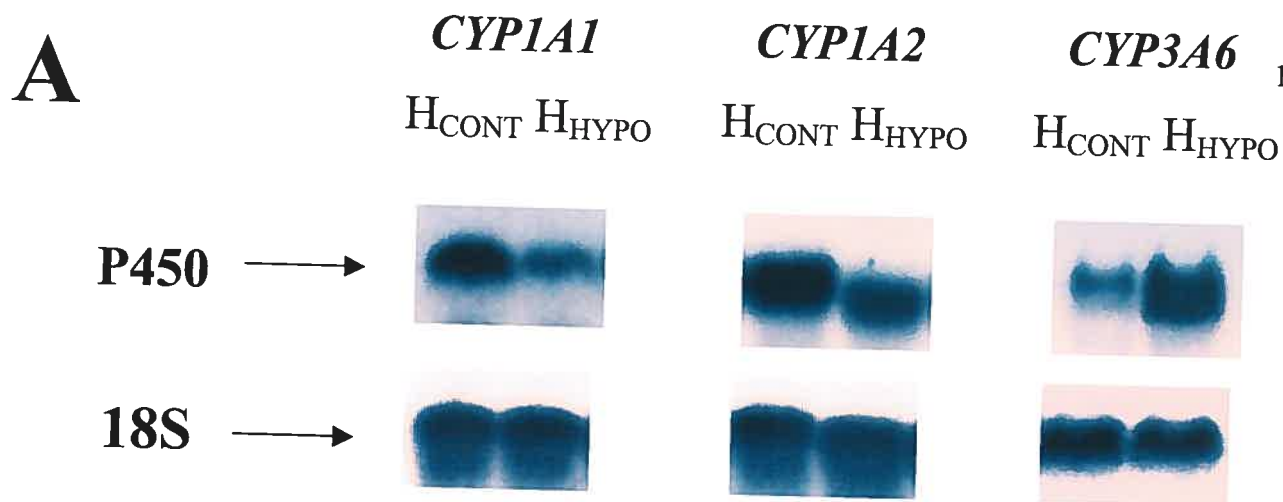


Figure 6.2 Effect (A) of *in vivo* 48 h acute moderate hypoxia on the amount of *CYP1A1*, *1A2* and *3A6* mRNA in hepatocytes of control rabbits (H_{CONT}) and rabbits subjected to hypoxia (H_{HYP}); (B) effect of serum from control rabbits (S_{CONT}) and rabbits with acute moderate hypoxia (S_{HYP}) on the amount of *CYP1A1*, *1A2* and *3A6* mRNA incubated for 24 h with hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}); and (C) effect of S_{CONT} and S_{HYP} on the amount of *CYP1A1*, *1A2* and *3A6* mRNA following 24 h incubation with hepatocytes from rabbits with hypoxia (H_{HYP}).

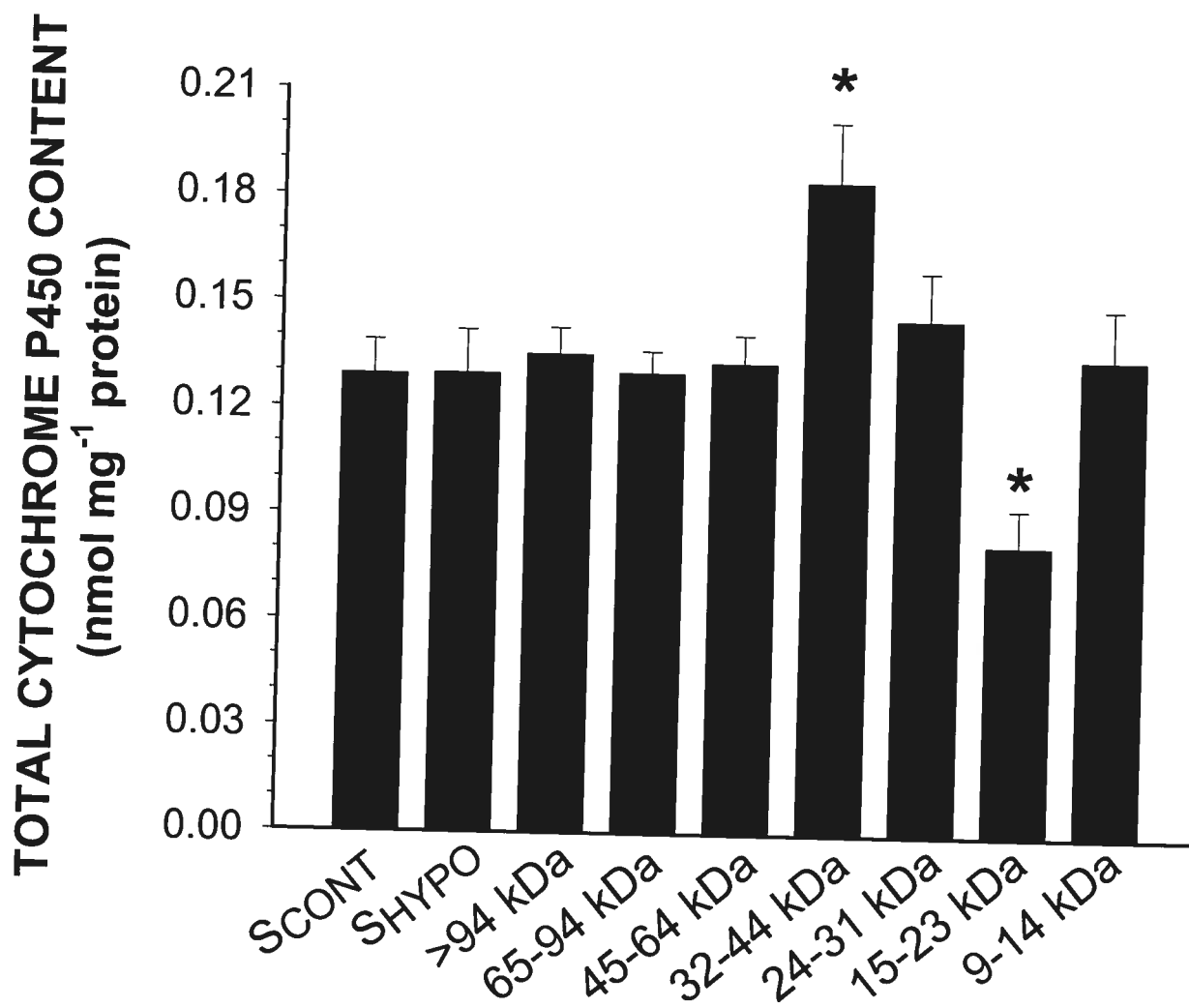


Figure 6.4 Effect of serum of control rabbits (S_{CONT}) ($n = 10$), serum from rabbits with acute moderate hypoxia (S_{HYPO}) ($n = 12$), and HPLC fractions of S_{HYPO} ($n = 12$) incubated for 24 h with hepatocytes from rabbits with acute moderate hypoxia on cytochrome P450 content. Data is presented as mean \pm standard error. * $p < 0.05$ compared with S_{CONT} .

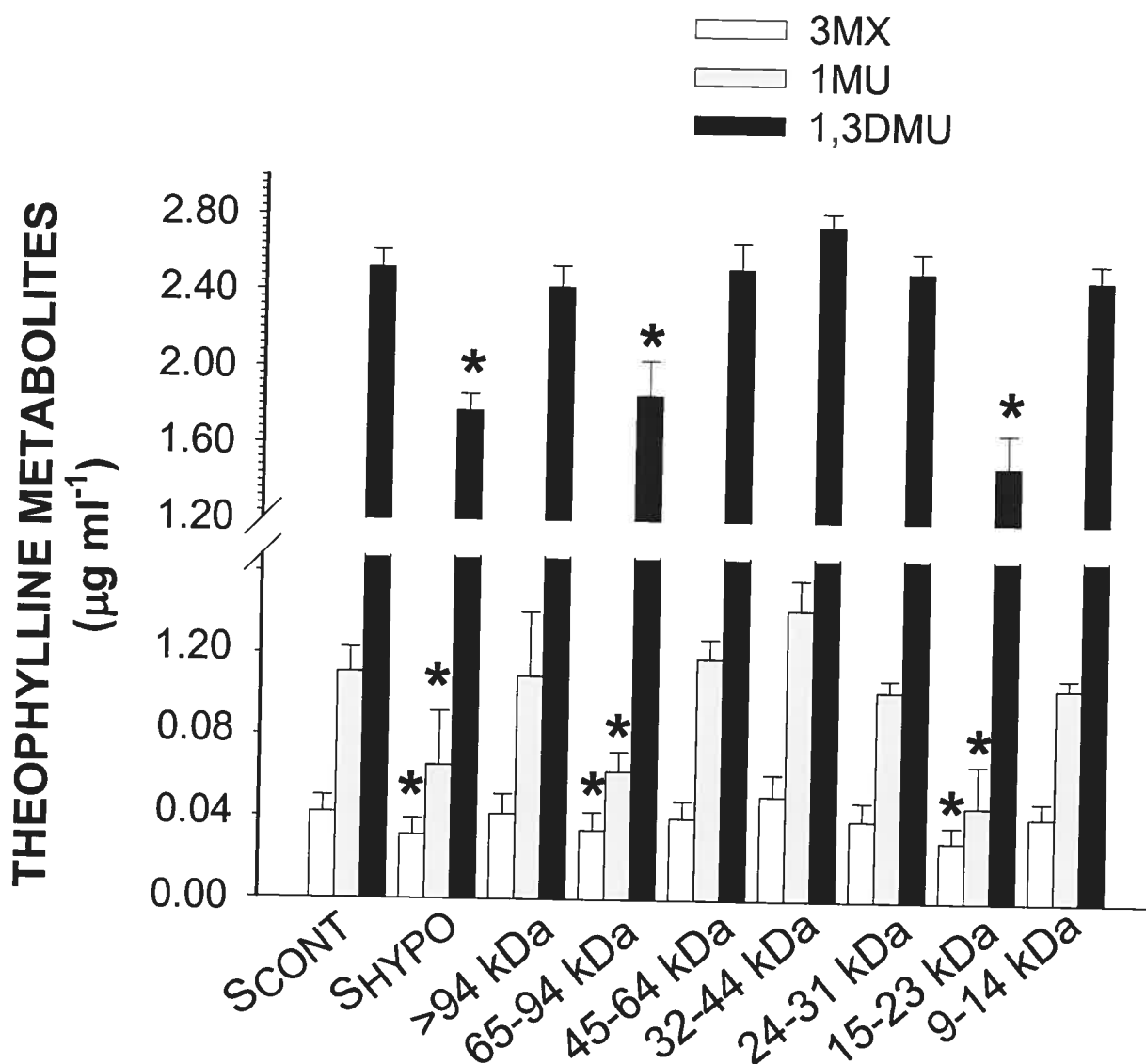


Figure 6.5 Effect of serum of control rabbits (S_{CONT}) (n = 10), serum from rabbits with acute moderate hypoxia (S_{HYP}O) (n = 7), and HPLC fractions of S_{HYP}O (n = 12) incubated for 24 h with hepatocytes from rabbits with acute moderate hypoxia on the formation of theophylline metabolites. Data is presented as mean \pm standard error. * p<0.05 compared with S_{CONT}.

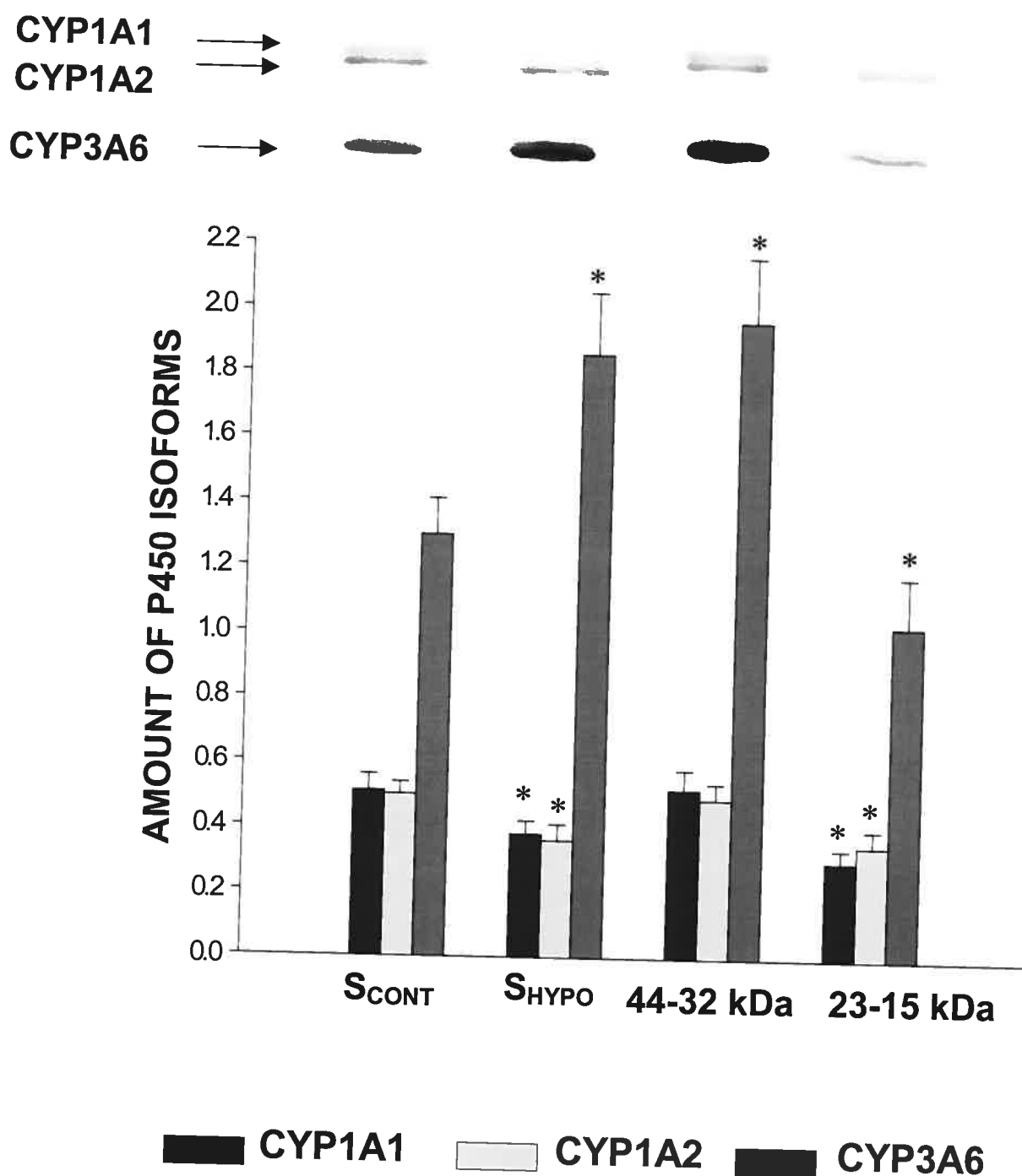


Figure 6.6 Effect of serum of control rabbits (S_{CONT}) (n = 10), serum from rabbits with acute moderate hypoxia (S_{HYP}O) (n = 7), and HPLC fractions of S_{HYP}O (n = 7) on the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins in hepatocytes from rabbits with acute moderate hypoxia (H_{HYP}O) following 24 h incubation. Right lane bands are representative Western blots of CYP1A1, 1A2 and 3A6. Data is presented in arbitrary units as mean \pm standard error. * p < 0.05 compared with control.

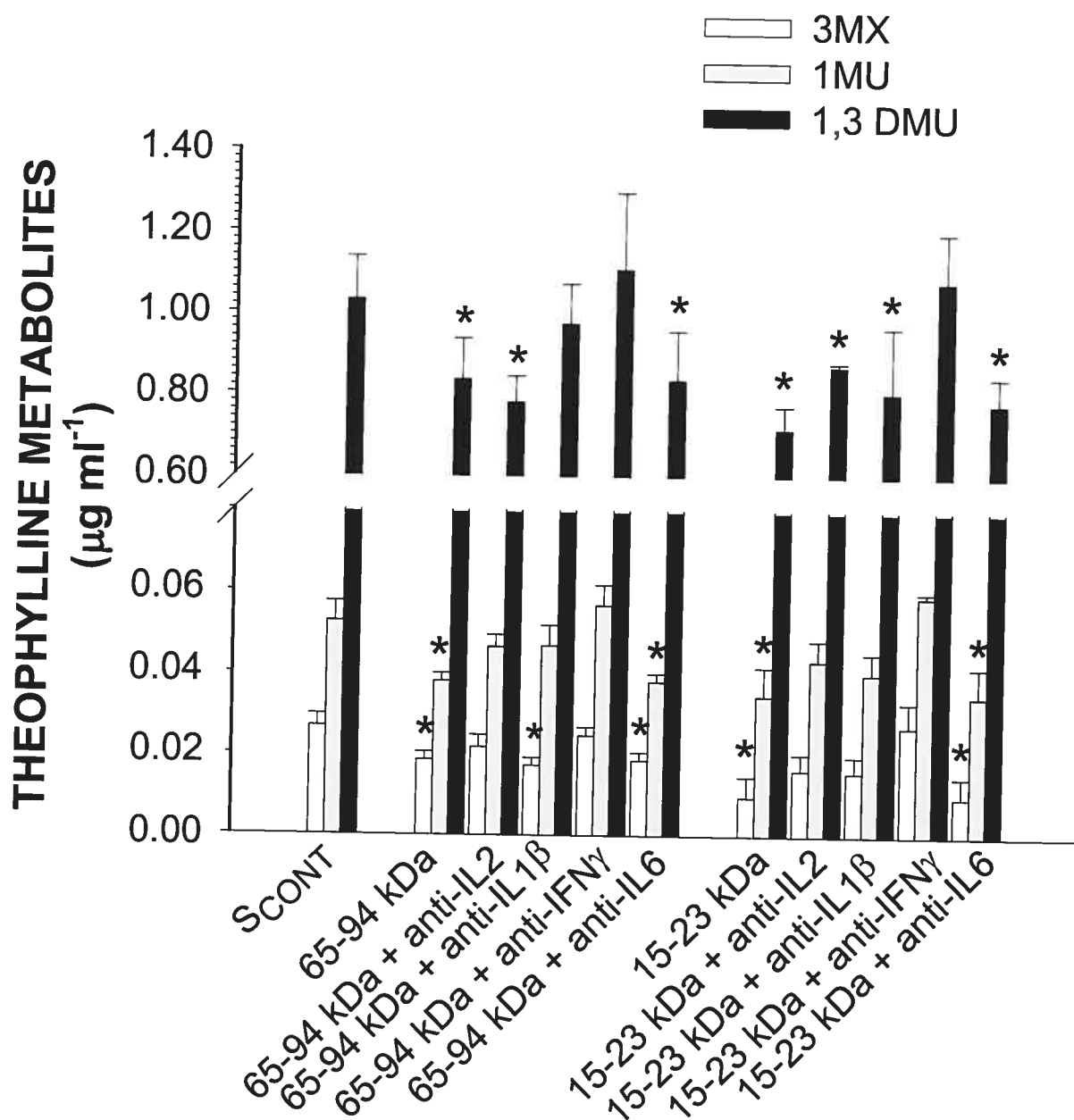


Figure 6.7 Effect of anti-cytokine antibodies on the ability of the 65-94 kDa and 15-23 kDa serum fractions to modify the formation of theophylline metabolites incubated for 4 h with hepatocytes from rabbits with acute moderate hypoxia. S_{CONT} is serum from control rabbits; IL-2, IL-1 β , IL-6 and IFN- γ are interleukin-2, -1 β , -6 and interferon- γ , respectively. Data is presented as mean \pm standard error. * $p < 0.05$ compared with control.

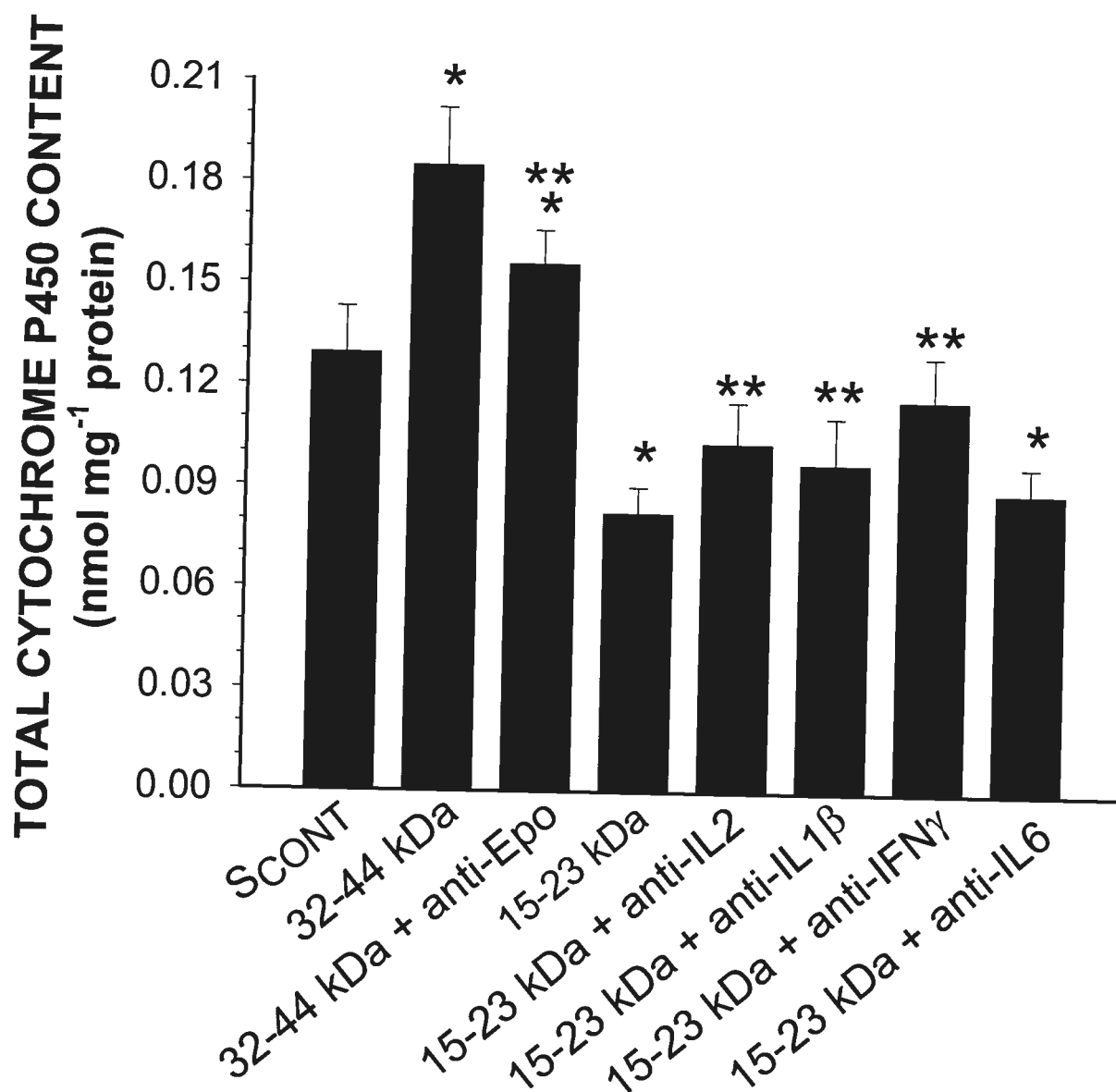


Figure 6.8 Effect of anti-cytokine antibodies on the ability of the 32-44 kDa and 15-23 kDa serum fractions to modify P450 content incubated for 24 h with hepatocytes from rabbits with acute moderate hypoxia. S_{CONT} is serum from control rabbits; Epo is erythropoietin; IL-2, IL-1β, IL-6 and IFN-γ are interleukin-2, -1β, -6 and interferon-γ, respectively. Data is presented as mean ± standard error. *, ** p<0.05 compared with control and with the serum fraction without the antibody, respectively.

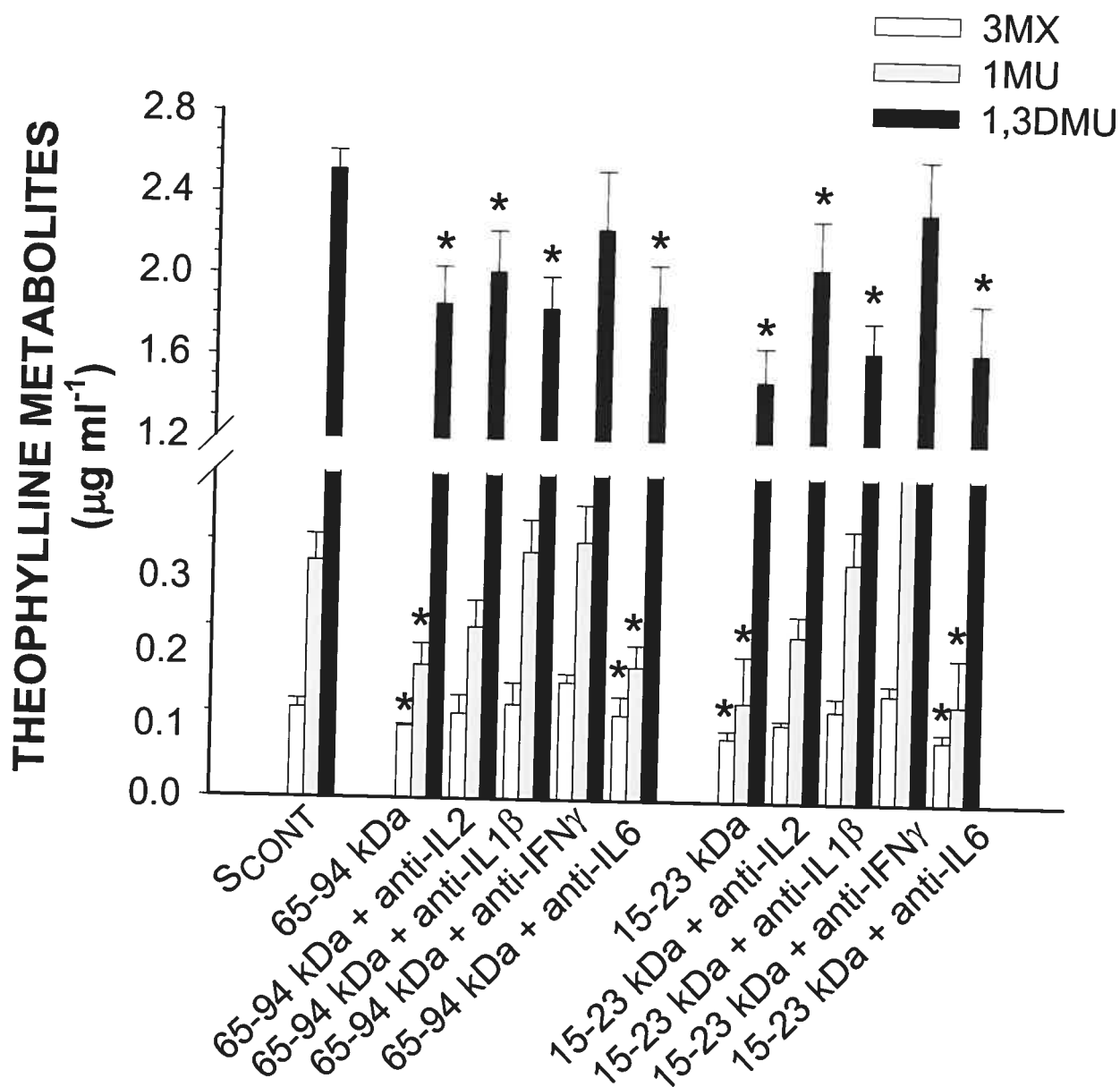


Figure 6.9 Effect of anti-cytokine antibodies on the ability of the 65-94 kDa and 15-23 kDa serum fractions to modify the formation of theophylline metabolites incubated for 24 h with hepatocytes from rabbits with acute moderate hypoxia. SCONT is serum from control rabbits; IL-2, IL-1 β , IL-6 and IFN- γ are interleukin-2, -1 β , -6 and interferon- γ , respectively. Data is presented as mean \pm standard error. * $p < 0.05$ compared with control.

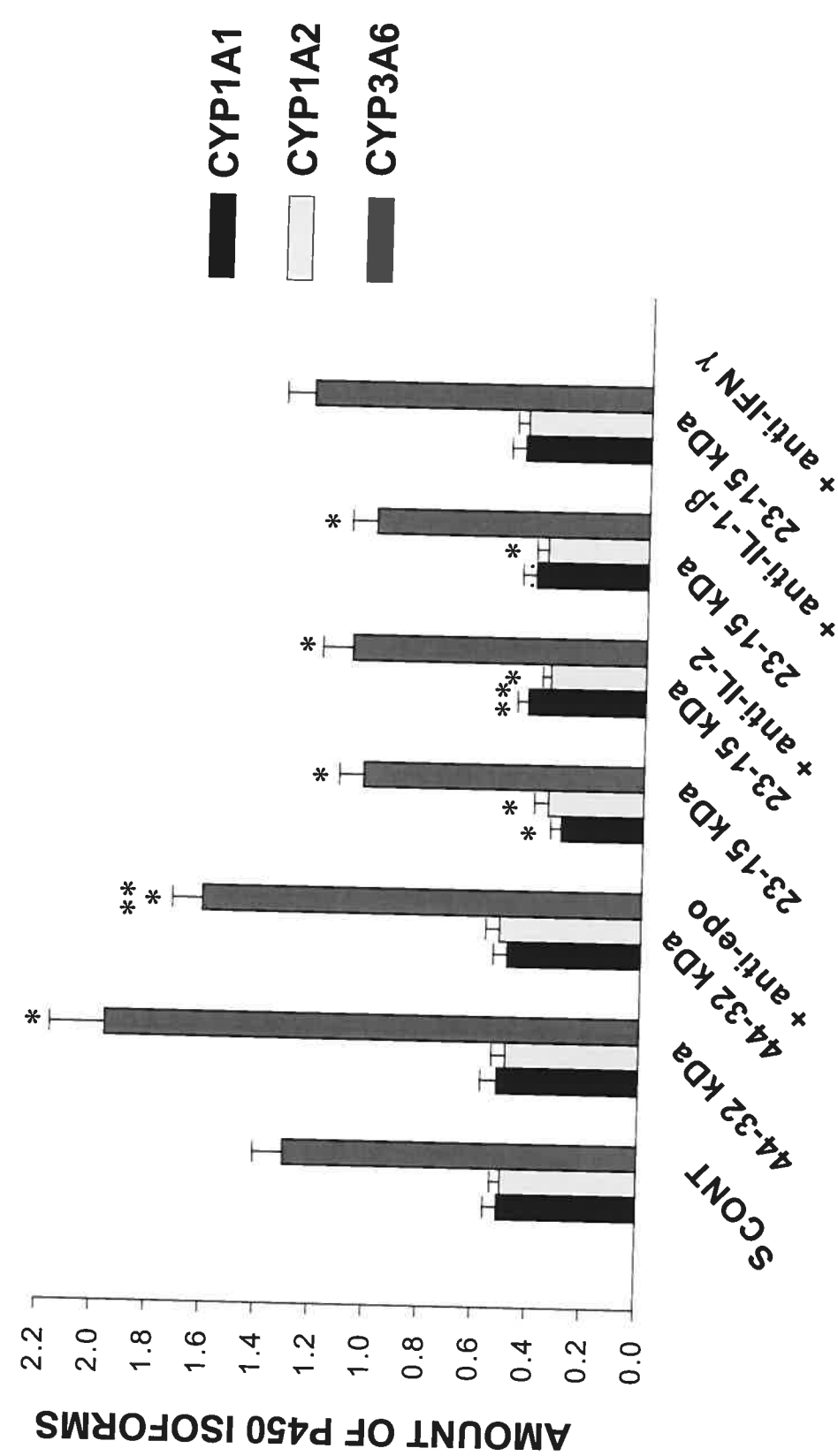


Figure 6.10 Effect of anti-cytokine antibodies on the ability of 32-44 kDa and 15-23 kDa serum fractions to modify the amount of CYP1A1, 1A2 and 3A6 apoproteins incubated for 24 h with hepatocytes from rabbits with acute moderate hypoxia. SCONT is serum from control rabbits; Epo is erythropoietin; IL-2, IL-1 β , IL-6 and IFN- γ are interleukin-2, -1 β , -6 and interferon- γ , respectively. Right lane bands are representative Western blots of CYP1A1, 1A2 and 3A6. Data is presented in arbitrary units as mean \pm standard error. *, ** p < 0.05 compared with control and with the serum fraction without the antibody, respectively.

CHAPITRE 7

HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR-1 AND ACTIVATOR PROTEIN-1 MODULATE THE UP-REGULATION OF CYP3A6 INDUCED BY HYPOXIA

Caroline Fradette and Patrick du Souich

British Journal of Pharmacology (2003) 140(6), 1146-1154.

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montréal,
Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

Abstract

1 Moderate hypoxia *in vivo* and serum from rabbits subjected to moderate hypoxia (S_{HYP0}) *in vitro* reduce CYP1A1 and 1A2 P450 isoforms and up-regulate CYP3A6. The aim of this project was to investigate the signal transduction pathways implicated in the up-regulation of CYP3A6 expression by hypoxia.

2 Hypoxia *in vivo* and S_{HYP0} *in vitro* increased the expression of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and c-jun, as well as CYP3A6. By electrophoresis mobility shift assay it was shown that HIF-1 and activator protein-1 (AP-1) bind to CYP3A6 oligonucleotide probe after exposure to hypoxia *in vivo* and S_{HYP0} *in vitro*. The effects of hypoxia *in vivo* or S_{HYP0} *in vitro* were reproduced by $CoCl_2$ and lead acetate, activators of HIF-1 and AP-1, respectively.

3 PD98059, a p42/44 MAPK inhibitor, prevented the increase of CYP3A6 and c-jun, but did not impede the increase of HIF-1 α and binding to CYP3A6 oligonucleotide probe. Genistein, an inhibitor of protein tyrosine kinases (PTK), prevented the increase in HIF-1 α , c-jun and CYP3A6, as well as HIF-1 and AP-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe. Moreover, hypoxia *in vivo* induced constitutive androstane receptor (CAR) as well as CAR binding to CYP3A6 oligonucleotide probe, but not pregnane X receptor (PXR).

4 In conclusion, hypoxia *in vivo* and S_{HYP0} induce the expression of CYP3A6. The *in vitro* induction of CYP3A6 by S_{HYP0} is PTK- and p42/44 MAPK-dependent. The present data supports the hypothesis that HIF-1 and AP-1 are part of the signalling pathway leading to CYP3A6 induction by hypoxia.

Key words: CYP3A6, CYP1A1, CYP1A2, hypoxia, HIF-1, AP-1, MAPKs, enzyme induction.

Abbreviations: AhR aryl hydrocarbon receptor; AP-1 activator protein-1; Arnt aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator; CAR constitutively activated receptor; COUP-TF chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor; DFB 3,4-difluorobenzyloxy-5, 5 dimethyl-4-(4-methylsulfonyl phenyl)-(5H)-furan-2-one; DFH 3-hydroxy-4-(4-methylsulfonyl phenyl)-(5H)-furan-2-one; EPO erythropoietin; ERK extracellular-regulated kinase; GR glucocorticoid receptor; H_{CONT} hepatocytes from control rabbits; H_{HYP} hepatocytes from rabbits with hypoxia; HIF-1 hypoxia-inducible factor 1; HNF-4 hepatocyte nuclear factor 4; IL-1 β interleukin 1 β ; JNK c-Jun N-terminal kinase; MAPK mitogen-activated protein kinase; MEK mitogen-activated protein kinase kinase; PKC protein kinase C; PTK protein tyrosine kinase; PXR pregnane X receptor; RXR retinoid X receptor; S_{CONT} serum from control rabbits; S_{HYP} serum from rabbits subjected to moderate hypoxia; TNF- α tumour necrosis factor α ; USF-1 upstream stimulatory factor-1; VEGF vascular endothelial growth factor; WMR William's medium E; XREM xenobiotic-responsive enhancer module.

Introduction

Moderate hypoxia *in vivo* and serum from rabbits subjected to moderate hypoxia (S_{HYPO}) *in vitro* reduce the hepatic biotransformation of drugs eliminated through CYP1A1 and 1A2 P450 isoforms. On the other hand, the same experimental conditions induce CYP3A6 expression through a pretranslational mechanism (Kurdi *et al.*, 1999; Fradette *et al.*, 2002). Induction of CYP3A6 by xenobiotics and steroids is regulated by two “orphan” nuclear receptors, pregnane X receptor (PXR) and constitutive androstane receptor or constitutively activated receptor (CAR) (Sueyoshi & Negishi, 2001). However, the mechanisms underlying the up-regulation of CYP3A6 under hypoxic conditions remain unknown.

Hypoxia activates transcription factors, which regulate the adaptive response of the cells to hypoxia (Semenza, 2000; Hur *et al.*, 2001). Cells adapt to low partial pressure of oxygen by up-regulating the transcription of multiple genes, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), erythropoietin (EPO), and several glycolytic enzymes. These target genes are induced by a common transcription factor, hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). HIF-1 is a heterodimer composed of α and β subunits. HIF-1 β is the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt), which is also a heterodimerisation partner of the aryl hydrocarbon receptor (AhR). Under normoxic conditions, HIF-1 α is a very unstable protein rapidly degraded. Hypoxia stabilizes HIF-1 α allowing the formation of the heterodimer HIF-1 α/β that binds to DNA (Semenza, 2000).

Activator protein-1 complex (AP-1) is also activated by hypoxia, through a c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dependent pathway. Activation of JNK results in the induction of the immediate-early-response genes *c-fos*, *c-jun* and *erg-1* (Gozal *et al.*, 1999; Michiels *et al.*, 2000). Dimerization of these early response genes forms AP-1 that binds to DNA to modulate gene transcription. AP-1 activation by hypoxia cooperates with HIF-1 to increase the transcription of genes. The activation of both HIF-1 and AP-1 involves members of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal-transduction pathways (Salnikow *et al.*, 2002).

The aim of this study was to investigate the role of HIF-1, AP-1, CAR and PXR in the up-regulation of CYP3A6 induced by moderate hypoxia. To this purpose, we assessed the effect of S_{HYPPO} , $CoCl_2$ (an activator of HIF-1), and lead acetate (an activator of AP-1) on the expression of HIF-1 α , c-jun and CYP3A6, as well as on the binding of HIF-1 and AP-1 to CYP3A6 oligonucleotide probe. The results demonstrate that hypoxia *in vivo* as well as S_{HYPPO} , $CoCl_2$ and lead increase the expression of HIF-1 α , c-jun and CYP3A6, and activate HIF-1 and AP-1 to bind to CYP3A6 oligonucleotide probe. Inhibition of protein tyrosine kinases with genistein prevents the increase and binding of HIF-1 and AP-1 to CYP3A6 oligonucleotide probe, as well as the increase of CYP3A6. On the other hand, inhibition of p42/44 MAPKs impedes the increase of c-jun and CYP3A6. The up-regulation of CYP3A6 by serum from rabbits with hypoxia appears independent of CAR and PXR. Hypoxia *in vivo*, $CoCl_2$ and lead down-regulate CYP1A1 and 1A2.

Methods

Animals and hepatocyte collection

Male New Zealand White rabbits (1.8-2.2 Kg) were obtained from Ferme Charles Rivers (St-Constant, Québec, Canada). Rabbits were maintained on Purina Laboratory Chow and water *ad libitum* for at least 7 days before any experimental work was undertaken. To induce hypoxia, rabbits were introduced in a plexiglas chamber (0.75 x 1.20 x 1.25 m³) with a fractional concentration of inspired O₂ (FiO₂) of 8%, adjusted with an oxygen monitor (OM-15, Sensor Medics Corp., CA, U.S.A.) connected to an electrovalve (Asco Valves, Brantford, Ontario, Canada) that allowed the access of nitrogen into the chamber, which displaced the air off. Control rabbits were also placed into the chamber for the experiments, but breathing room air (FiO₂ = 21%). All the rabbits remained 48 h in the chamber where they had access to Purina Laboratory Chow and water *ad libitum*. All the experiments were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for use of laboratory animals.

Hepatocytes from rabbits with hypoxia (H_{HYP}O) and from control rabbits (H_{CONT}) were isolated 48 h after the induction of hypoxia or breathing room air, respectively, according to the two step liver perfusion method of Seglen (1976) with minor modifications (El-Kadi *et al.*, 1997). Cell cultures were always conducted under sterile conditions. Viability was assessed by trypan blue exclusion to ensure that it was greater than 90%; viability was not affected by *in vivo* hypoxia or any other experimental condition. Cell concentration was adjusted to 1 x 10⁶ per ml with William's medium E (WME) supplemented with 10% calf serum and 1 µM insulin. Aliquots of 2 ml of the hepatocytes in suspension were transferred into 6-well plastic culture plates (Falcon,

Becton Dickinson Labware, Rutherford, NJ) coated with type 1 rat tail collagen and incubated for 2 h at 37°C in an atmosphere of 95% O₂ and 5% CO₂ to allow for stabilisation. The medium was replaced with fresh WME supplemented with 10% calf serum and 1 µM insulin, and the H_{CONT} were then incubated with 200 µl of serum from control rabbits (S_{CONT}), 200 µl of S_{HYP}O, 100 µM CoCl₂ and 10 µM lead acetate for 24 h. The incubation of H_{CONT} with CoCl₂ and lead acetate was conducted in absence of serum. Cells were also pre-treated for one hour with 100 µM PD98059 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) and 150 µM genistein (Sigma Chemical) in 0.05% of DMSO at 37°C (Hur *et al.*, 2001; Agani & Semenza, 1998).

Following 24 h of incubation, CYP3A activity and expression, and CYP1A1/1A2, HIF-1α, and c-jun expression, as well as HIF-1 and AP-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe were documented.

Rabbit serum preparation

Blood samples (10 ml) were withdrawn from the rabbits 48 h after the induction of hypoxia and from control rabbits in a sterile Vacutainer Brand SST (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada). Blood was allowed to clot at room temperature for 2 h; the samples were centrifuged at 2500 r.p.m. for 5 min, and the serum was decanted and stored frozen at -80°C in 1 ml aliquots until use. In samples handled as described, serum mediators conserved their activity for up to 12 months.

CYP3A activity

The activity of CYP3A was determined by measuring the ability of the hepatocytes to convert 3,4-difluorobenzyloxy-5, 5 dimethyl-4-(4-methylsulfonyl phenyl)-(5H)-furan-2-one (DFB), a probe of CYP3A, to 3-hydroxy-4-(4-methylsulfonyl phenyl)-(5H)-furan-2-one (DFH), its fluorescent metabolite (Chauret & Nicoll-Griffith, 1999). Briefly, 60 μ M of DFB were incubated with the hepatocytes for 15 min, an aliquot of the supernatant was then transferred to a microtiter plate and quenched with an equal volume of acetonitrile containing 40% TRIS buffer (0.05M). The fluorescence of the metabolite DFH was measured at excitation and emission wavelengths of 360 nm and 440 nm, respectively, using a fluorescent plate reader (Wallac Victor² 1420 multilabel counter) and expressed in arbitrary units (Fradette *et al.*, 2002; Silva & Nicoll-Griffith, 2001).

Western blot analysis

Hepatocytes were washed, harvested in ice-cold PBS and centrifuged at 1500g for 5 min. The pellet was resuspended in cold lysis buffer (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, protease inhibitor mixture), and cells were allowed to swell on ice for 15 min, and vortexed for 30 s. The amount of proteins in hepatocytes was measured in cell lysate by the method of Lowry (Lowry *et al.*, 1951). For Western blot analysis, 50 μ g of cell lysate were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (Fradette *et al.*, 2002). Separated proteins were electrophoretically transferred to a nitro-cellulose membrane using a semi-dry transfer process (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.). CYP1A1 and 1A2 were detected with a polyclonal anti-rabbit CYP1A1 (Oxford Biochemical Research, Oxford, MI, U.S.A.)

diluted 1:100 in 5% non-fat milk in TBS-T (0.1% Tween 20) and visualized with an alkaline phosphatase conjugated secondary antibody using nitro blue tetrazolium as substrate. Membranes were incubated with specific antibodies against CYP3A6 diluted 1:500 (Oxford Biochemical Research, Oxford, MI, U.S.A.), HIF-1 α diluted 1:400 (Novus Biological, Littleton, CO), c-jun diluted 1:1000 (BD Biosciences, Mississauga, CAN), hCAR diluted 1:3000 (M. Negishi, National Institute on Environmental Health Sciences, Triangle Park, NC), and PXR diluted 1:400 (P. Maurel, Centre National de la Recherche Scientifique, Montpellier, France) using a secondary antibody conjugated with a chemiluminescence reagent (horseradish peroxidase enzyme) and visualized by autoradiography. In each gel, 50 μ g of proteins extracted from the same control hepatocytes, with constant amounts of CYP1A1, 1A2 and 3A6, were used as reference proteins. The assays were linear in the range of protein amounts assessed under the present experimental conditions. The intensity of the bands was quantified by means of the software Un-Scan-It-Gel (Silk Scientific Inc., Orem, Utah) and is represented in arbitrary units.

Analysis of the CYP3A6 5' region

Inspection of the *CYP3A6* 5' region revealed a potential HIF-1 binding-site sequence that was derived from bona fide HIF-1 binding sites previously identified by Wang *et al.* (1995) in genes encoding EPO and glycolytic enzymes. The *CYP3A6* sequence 5'-CACGTGGG-3' was located between -831 and -824 in the same orientation as the transcriptional unit. In the same way, inspection of the *CYP3A6* promoter revealed a potential AP-1 binding-site sequence 5'-TGACTCC-3' that was located between -109 and -103 bp.

Preparation of Nuclear Extracts

Hepatocytes were washed, harvested in ice-cold PBS and centrifuged at 1500xg for 5 min. The pellet was resuspended in cold lyses buffer (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, and protease inhibitor mixture), and cells were allowed to swell on ice for 15 min, to be vortexed for 30 s. After centrifugation, the nuclear pellet was resuspended in ice-cold nuclear suspension buffer (20 mM HEPES pH 7.9, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, and protease inhibitor mixture). Finally, the nuclear extract was centrifuged for 5 min, and the supernatant was frozen at -80°C until use for the electrophoretic mobility shift assays.

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSAs)

The primers used for HIF-1 α (5'-GGTCTCCCACGTGGGTGCA-3'), AP-1 (5'-GGGCACCTGACTCCCCGG-3'), and CAR (5'-ACATGAACTCAGAGGAGGTCACCACGG) oligonucleotides are all *CYP3A6* promoter sequences and were synthesized by Biocorp (Montréal, Québec). To generate double stranded consensus oligonucleotides, the sense strands were annealed to a 10-fold excess of antisense strands by heating to 85°C for 10 min. The consensus oligonucleotides (5 pmol) were end-labelled with [γ -³²P]ATP (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) using T4 polynucleotide kinase (Gibco Life Technologies, Burlington, CAN) and then purified on gel. Nuclear extracts (10-15 μ g) were incubated on ice for 20 min with reaction buffer, containing 1 μ g of poly(dI-dC) (Amersham Pharmacia Biotech), 50 mM Tris-HCl (pH 7.9), 5 mM MgCl₂, 2.5 mM dithiothreitol, 250 mM NaCl, 20% glycerol, and 2.5 mM EDTA in a total volume of 24 μ l. One

microliter of ^{32}P -labeled (30000 cpm) oligonucleotide probe was added to the reaction mixture and further incubated at room temperature for 20 min. For supershift assays, the antibodies were added to the reaction mixture and incubated on ice before loading. For all supershift assays, serum from control rabbits was used as negative control. For competition studies, 100-fold excess of unlabeled oligonucleotide was added to the reaction mixture during the incubation on ice before the addition of the labelled probe. DNA-protein complexes were resolved by polyacrylamide gel electrophoresis using a 4% non-denaturing gel and run at 180V in $0.25 \times \text{TBE}$ (45 mM Tris borate and 1mM EDTA). Gels were dried, and specific bands were quantified using the software Un-Scan-It-Gel (Silk Scientific Inc., Orem, Utah). The results are represented in arbitrary units.

Drugs and chemicals

Percoll, William's medium E, calf serum, type I rat tail collagen, NaCl, KCl, KH_2PO_4 , HEPES, EDTA, EGTA, glucose, CoCl_2 and lead acetate were purchased from Sigma Chemicals (Sigma, St. Louis, MO). DFB and DFH were provided by Merck Frosst Canada (Kirkland, Québec, Canada), and insulin was acquired from Boehringer Mannheim Biochemica (Mannheim, Germany).

Statistical analysis

All results are presented as mean \pm s.e. Activity of CYP3A and amount of proteins assessed by Western blot or EMSA are presented in arbitrary units. The comparison of results from the various experimental groups and their corresponding controls was

carried out by a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Newman-Keuls *post hoc* test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Effect of hypoxia in vivo on CYP3A6, HIF-1 α and c-jun

Exposure of rabbits to an 8 % FiO₂ atmosphere generated a stable hypoxemia, with an average arterial partial pressure of O₂ of 34.2 ± 1.3 mmHg, without influencing the arterial partial pressure of CO₂ ($\approx 20.7 \pm 1.0$) and arterial pH (7.47 ± 0.05). Compared with H_{CONT}, 48 h of hypoxia *in vivo* increased the amount of CYP3A6 (n = 5), of HIF-1 α (n = 8), and of c-jun (n = 5) (Figure 1 A). With reference to H_{CONT}, the increase in CYP3A6 expression in H_{HYP}O was reflected by a greater activity, e.g. 6589 ± 250 vs. 11571 ± 295 (arbitrary units, n = 5) .

In nuclear extracts of H_{HYP}O, protein complexes were detected binding to CYP3A6 oligonucleotide probes (Figure 1 B). The protein complexes were supershifted with the use of anti-HIF-1 α and anti-c-jun antibodies, (Figure 1 B, band SS). Competition studies with 100-fold excess of unlabeled probes efficiently competed with the labelled probes (data not shown).

Effect of S_{HYP}O, CoCl₂ and lead acetate in vitro on CYP3A6, HIF-1 and AP-1

By reference to the effect of S_{CONT}, incubation of H_{CONT} with S_{HYP}O for 24 h enhanced the amount of CYP3A6 (n = 6), the amount of HIF-1 α (n = 8) and that of c-jun (n = 6) (Figure 2). To confirm the role of HIF-1 and AP-1 on CYP3A6 expression, two activators of these transcription factors, CoCl₂ and lead acetate were used (Pyatt *et al.*, 1996; Sultana *et al.* 1999). By comparison with saline, incubation of H_{CONT} with CoCl₂ for 24 h enhanced the expression of CYP3A6 (n = 6), of HIF-1 α (n = 10), and of c-jun (n = 7). On the other hand, lead acetate increased the expression of CYP3A6 (n =

6) and that of c-jun ($n = 7$). The effect of CoCl_2 was additive to the effect of lead acetate, in the sense that the expression of CYP3A6 increased by 40% ($n = 6$) when H_{CONT} were incubated for 24 h with both substances simultaneously (Figure 2). Compared with the effect of S_{CONT} , incubation of H_{CONT} with S_{HYPO} , CoCl_2 , lead acetate, and the combination of CoCl_2 and lead acetate increased the activity of CYP3A from 4952 ± 186 to 6387 ± 191 , to 6398 ± 201 , 6391 ± 199 , and 7184 ± 219 , respectively ($n = 6$ for each group, $p < 0.05$).

S_{HYPO} induced the binding of transcription factors HIF-1 and AP-1 to the CYP3A6 oligonucleotide probe. In addition, CoCl_2 and lead acetate promoted the binding of the transcription factors HIF-1 and AP-1, respectively, to the CYP3A6 oligonucleotide probe. Supershift analysis demonstrated that the protein complex included HIF-1 α and c-jun (Figure 3A and 3B).

Signal transduction pathways implicated in CYP3A6 up-regulation

H_{CONT} were preincubated with PD98059, an inhibitor of p42/44 MAPK, and genistein, a non-specific protein tyrosine kinase (PTK) inhibitor, and then exposed for 24 h to S_{CONT} , S_{HYPO} , CoCl_2 and lead acetate. PD98059 or genistein did not affect baseline values of HIF-1 α , c-jun and CYP3A6 in H_{CONT} (data not shown). However, PD98059 impeded the increment of CYP3A6 apoprotein induced by S_{HYPO} but not the increase in HIF-1 α amount (Figure 4 A) nor the binding of HIF-1 to CYP3A6 oligonucleotide probe (Figure 4 B). On the other hand, genistein prevented the effect of S_{HYPO} on CYP3A6 and HIF-1 α expression (Figure 4 A), as well as the binding of HIF-1 to the CYP3A6 oligonucleotide probe (Figure 4 B).

PD98059 impeded the increment of CYP3A6 apoprotein induced by CoCl_2 but not the increase in HIF-1 α amount (Figure 5 A) nor the binding of HIF-1 to CYP3A6 oligonucleotide probe (Figure 5 B). On the other hand, genistein prevented the effect of CoCl_2 on CYP3A6 and HIF-1 α expression (Figure 5 A), as well as the binding of HIF-1 to the CYP3A6 oligonucleotide probe (Figure 5 B). Genistein and PD98059 prevented the effect of S_{HYPO} (Figure 6 A) and lead acetate (Figure 7 A) on c-jun and CYP3A6 amounts, as well as AP-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe (Figures 6 B and 7 B).

Effect of hypoxia in vivo and of S_{HYPO} on CAR and PXR expression

Compared with H_{CONT} , 48 h of hypoxia *in vivo* increased the amount of CAR ($n = 5$, $p < 0.05$) but did not elicit any effect on PXR amount. When H_{CONT} were exposed to S_{CONT} for 24 h, the amounts of CAR and PXR increased ($n = 5$). In presence of S_{HYPO} , the amount of CAR was 20% higher than that estimated after the incubation with S_{CONT} ($n = 6$). Incubation of H_{CONT} for 24 h with CoCl_2 or lead acetate did not change CAR and PXR amounts (Figure 8 A). *In vivo*, hypoxia for 48 h promoted the binding of the nuclear receptor CAR to the CYP3A6 oligonucleotide probe (Figure 8 B). Supershift analysis demonstrated that the protein complex included CAR. On the other hand, S_{CONT} or S_{HYPO} did not activate CAR binding to the CYP3A6 oligonucleotide probe (Figure 8 B), even in presence of CYP3A6 up-regulation. Competition studies with 100-fold excess of unlabelled probes efficiently competed with the labelled probes (data not shown).

Effect of hypoxia in vivo, and of S_{HYP} , $CoCl_2$ and lead acetate in vitro on CYP1A1 and 1A2 expression

Compared with rabbits breathing a 21% FiO_2 , hypoxia reduced the amounts of CYP1A1 and 1A2 apoproteins ($n = 5$) (Figure 9). No changes in the amount of CYP1A1 and 1A2 were observed following the incubation of H_{CONT} with S_{HYP} . On the other hand, $CoCl_2$ and lead acetate diminished the amount of CYP1A1 and 1A2 apoproteins ($n = 6$) (Figure 9).

Discussion

This study demonstrates that *in vivo*, hypoxia enhances the expression of CYP3A6, CAR, HIF-1 and AP-1, and prompt HIF-1 and AP-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe. *In vitro*, S_{HYP}O augments HIF-1 and AP-1 expression and stimulates their binding to CYP3A6 oligonucleotide probe. A p42/44 MAPK-dependent protein phosphorylation is required to increase CYP3A6 expression. In response to hypoxia, HIF-1 is detected in most cell types and activates the transcription of genes encoding proteins that will increase O₂ delivery (EPO and VEGF), allow metabolic adaptation (glucose transporters, glycolytic enzymes), or promote cell survival (insulin-like growth factor 2) (Semenza, 1999a). The binding of HIF-1 and AP-1 to CYP3A6 oligonucleotide probe lets us assume that *CYP3A6* gene is another target for HIF-1 and AP-1.

The underlying mechanisms by which cells sense a decrease in O₂ concentration and transduce this signal to HIF-1 α remain largely unknown (Semenza, 1999b). Several mechanisms have been proposed to mediate the hypoxic transcriptional response, such as: a) changes in activity of the iron contained heme groups or in iron/sulfur clusters under hypoxic conditions (Goldberg *et al.*, 1988), b) release of reactive oxygen intermediates generated by a flavoprotein-containing NAD(P)H oxidase or by the mitochondria (Fandrey *et al.*, 1994; Chandel *et al.*, 1998), and c) release of growth factors and cytokines, such as epidermal growth factor, interleukin 1 β (IL-1 β), tumour necrosis factor α (TNF- α), angiotensin II, transforming growth factor β_1 and hepatocyte growth factor, capable to stabilize HIF-1 α (Wenger, 2002). Since the changes in cytochrome P450 induced by hypoxia are mediated by the release in blood of IL-1 β , IL-

2, interferon- γ and circulating EPO (Fradette *et al.*, 2002), we may speculate that these circulating have contributed to increase HIF-1 and AP-1 expression.

The regulation of CYP3A6 expression by HIF-1 has similarities with the modulation of other proteins by HIF-1 (Salceda *et al.*, 1997). Confirming the report of Wang *et al.* (1995), HIF-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe induced by S_{HYPO} is prevented by genistein. In addition, the present results show that p42/44 MAPK is a required step for the increase in CYP3A6 expression, presumably by the transactivation of *CYP3A6* gene by HIF-1, but not for HIF-1 binding to *CYP3A6* promoter. On the other hand, p42/44 MAPK appears to modulate the transcriptional activity of HIF-1 but not the transactivation of VEGF gene (Richard *et al.*, 1999). These observations suggest that the role of p42/44 MAPK activation may differ as a function of the gene transactivated.

Hypoxia *in vivo* and S_{HYPO} *in vitro* increased the expression of c-jun and prompted AP-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe. Inhibition of PTK with genistein and p42/44 MAPK with PD98059 impeded AP-1 activation and binding to CYP3A6 oligonucleotide probe. The expression of AP-1 is regulated by calmodulin dependent mechanisms associated to the hypoxia-induced increase in intracellular Ca^{2+} , either from the influx of Ca^{2+} through L-type voltage gated Ca^{2+} channels (Berna *et al.*, 2001), or via the Ca^{2+} released from intracellular stores (Hampl *et al.*, 1995). The increase in intracellular Ca^{2+} activates extracellular-regulated kinase (ERK2), essential for c-fos and c-jun activation and prompts AP-1-dependent transcription. Both the activation of c-

jun expression and the AP-1-dependent transcription are sensitive to PTK inhibitors (Salnikow *et al.*, 2002; Premkumar *et al.*, 2000).

The effect of S_{HYPO} was reproduced by CoCl_2 which mimics the hypoxic environment by substituting for Fe^{2+} in the porphyrin ring of haemoglobin, thus causing a conformational change resulting in decreased oxygen affinity and effectively locking the heme molecule in a deoxygenated conformation (Goldberg & Schneider, 1994). By simulating hypoxia, CoCl_2 increased the amount of HIF-1 α and slightly that of c-jun. Binding of HIF-1 to CYP3A6 oligonucleotide probe was also enhanced, binding that was prevented by genistein, although not by PD98059. This may be explained by the fact that CoCl_2 causes a time-dependent tyrosine phosphorylation of MAPK kinase isoform ERK2, which is inhibited by PD98059 (Sultana *et al.*, 1999). According to our results, we postulate that the transactivation of *CYP3A6* gene requires a phosphorylation, but not the binding of HIF-1 to the *CYP3A6* promoter.

Lead acetate is a potent blocker of calcium channels, it activates calmodulin with higher affinity than Ca^{2+} and most importantly, picomolar concentrations can substitute for Ca^{2+} to activate protein kinase C (PKC) (Markovac & Goldstein, 1988), resulting in the activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) and MAPK (Ramesh *et al.*, 1999), and in the induction of the immediate-early-response genes *c-fos*, *c-jun*, and *erg-1* (Bressler *et al.*, 1999), which will form AP-1 by dimerization (Halazonetis *et al.*, 1988). Our results suggest that lead, by triggering the formation and nuclear transcription of AP-1, events requiring a PTK and p22/p44 MAPK, increases the expression of CYP3A6 subsequently to the binding of AP-1 to *CYP3A6* promoter.

By reproducing the effect of the mediators in serum, the experiments conducted with CoCl_2 and lead acetate strongly support that HIF-1 and AP-1 are directly implicated in the hypoxia-induced up-regulation of CYP3A6. Moreover, when hepatocytes were incubated with both CoCl_2 and lead, the up-regulation of CYP3A6 was greater than with any single agent, supporting independent and cooperative effects on CYP3A6 expression. This observation is in agreement with reports showing that in response to hypoxia, HIF-1 and AP-1 cooperate to increase the expression of the genes encoding for VEGF (Damert *et al.*, 1997) and tyrosine hydroxylase (Norris & Millhorn, 1995). The present results do not discard that hypoxia and S_{HYPO} , HIF-1 and AP-1 may modulate CYP3A6 steady-state expression by mechanisms other than CYP3A6 transcription.

The expression of CYP3A is modulated by several nuclear receptors, such as CAR, PXR, retinoid X receptor (RXR), hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4), and glucocorticoid receptor (GR) (Gibson *et al.*, 2002). PXR forms a heterodimer with RXR, which activates *CYP3A* transcription through binding to an ER6 element in the proximal promoter (Lehmann *et al.*, 1998). PXR is activated by numerous compounds known to induce CYP3A expression (Moore *et al.*, 2000). CAR is sequestered in the cytosol and translocates into the nucleus upon activation, presumably through several steps of phosphorylation, where it dimerises with RXR (Kawamoto *et al.*, 1999). Since both CAR and PXR are involved in the regulation of *CYP3A* gene, it was of interest to assess whether hypoxia activates these nuclear receptors. *In vivo*, hypoxia for 48 h induced CAR but not PXR protein expression; moreover, hypoxia enhanced CAR binding to CYP3A6 oligonucleotide probe. In H_{CONT} , S_{CONT} and S_{HYPO} induced the

expression of both CAR and PXR without prompting their binding to CYP3A6 oligonucleotide probe. Since CoCl_2 and lead acetate did not impact CAR and PXR expression, we may speculate that S_{CONT} and S_{HYPO} contain ligands to the glucocorticoid receptor known to activate these nuclear receptors. Our results support the postulate that hypoxia increases CYP3A6 expression independently of PXR, although *in vivo* CAR may be implicated.

We have shown that *in vivo* hypoxia reduces the expression of CYP1A1/1A2, down-regulation in part due to cytokines present in S_{HYPO} , such as interferon- γ , IL-1 β and IL-2 (Fradette *et al.*, 2002). In addition, *in vitro* CoCl_2 down-regulates CYP1A1/1A2 in control hepatocytes, e.g. constitutive CYP1A1/1A2, suggesting that several mechanisms underlie the reduction of CYP1A1/2 by hypoxia. The effect of CoCl_2 on CYP1A may be explained on the basis that stabilised HIF-1 α competes with AhR for Arnt resulting in the decrease in AhR/Arnt heterodimer and reduction in CYP1A1/1A2 expression (Chan *et al.*, 1999). Lead acetate also down-regulates CYP1A1/1A2, even if lead does not increase HIF-1 α expression or HIF-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe. On the other hand, S_{HYPO} did activate HIF-1 but did not down-regulate CYP1A1/1A2. All these apparently contradictory results support the presence of various mechanisms, HIF-1 dependent and independent, modulating the expression of CYP1A1/1A2.

Promoter regions of various *CYP3A* genes may contain several response elements or nuclear receptor binding sites with direct repeat-3 and -4, and everted repeat-6 motifs, such as the common regulatory elements found at -140 to -170 bp. Upstream,

there is a 230 bp distal element from -7836 to -7607-bp called xenobiotic-responsive enhancer module (XREM) (Sueyoshi & Negishi, 2001). Both, common positive regulatory elements and XREM are docking sites for CAR/PXR/RXR, and are implicated in the induction elicited by high doses of dexamethasone, rifampicin, and pregnenolone 16 α -carbonitrile. About -2 kb upstream, the glucocorticoid response element binds the glucocorticoid receptor, which is activated by low doses of dexamethasone (Quattrochi & Guzelian, 2001). XREM appears to be modulated by an upstream negative regulatory element, the chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF), and downstream, by a positive regulatory element, dNR3. In addition, HNF-4 and upstream stimulatory factor-1 (USF-1) are positive regulatory elements present in the region from -146 to -156 bp (Nakayama *et al.*, 2001). The present study allows to hypothesise that the two binding sites, -109 bp to bind AP-1 and at -831 bp to bind HIF-1, identified on *CYP3A6* promoter are positive regulatory elements.

Acknowledgments

Supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP - 43925). We are grateful to Pr Patrick Maurel (Centre National de la Recherche Scientifique, Montpellier, France) for providing PXR and CAR antibodies; Dr N. Chauret from Merck Frosst Canada for providing 3,4-difluorobenzyloxy-5,5 dimethyl-4-(4-methylsulfonyl phenyl)-(5H)-furan-2-one (DFB); Dr. M. Nemer laboratory for providing technical assistance for gel shift. The technical assistance of Ms Lucie Héroux is also gratefully acknowledged.

References

- AGANI, F. & SEMENZA, G.L. (1998). Mersalyl is a novel vascular endothelial growth factor gene expression and hypoxia-inducible factor 1 activity. *Mol. Pharm.* **54**, 749-754.
- BERNA, N., ARNOULD, T., REMACLE, J. & MICHIELS, C. (2001). Hypoxia-induced increase in intracellular calcium concentration in endothelial cells: role of the Na(+)-glucose cotransporter. *J. Cell. Biochem.* **84**, 115-131.
- BRESSLER, J., KIM, K.A., CHAKRABORTI, T. & GOLDSTEIN, G. (1999). Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. *Neurochem. Res.* **24**, 595-600.
- CHAN, W.K., YAO, G., GU, Y.Z. & BRADFIELD, C.A. (1999). Cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways. Demonstration of competition and compensation. *J. Biol. Chem.* **274**, 12115-12123.
- CHANDEL, N.S., MALTEPE, E., GOLDWASSER, E., MATHIEU, C.E., SIMON, M.C. & SCHUMACKER, P.T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 5015-5019.
- CHAURET, N., TREMBLAY, N., LACKMAN, R.L., GAUTHIER, J.Y., SILVA, J.S., MAROIS, J., YERGRIY, J.A. & NICOLL-GRIFFITH, D.A. (1999). Description of a 96-well plate assay to measure P4503A inhibition in human liver microsomes using a selective fluorescent probe. *Anal. Biochem.* **276**, 215-225.
- DAMERT, A., IKEDA, E. & RISAU, W. (1997). Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-induciblefactor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells. *Biochem. J.* **327**, 419-423.
- EL-KADI, A.O.S., MAURICE, H., ONG, H. & DU SOUICH, P. (1997). Down regulation of the hepatic cytochrome P450 by an acute inflammatory reaction: implication of human and animal serum, and intrahepatic mediators. *Br. J. Pharmacol.* **121**, 1164-1170.
- FANDREY, J., FREDE, S. & JELKMANN, W. (1994). Role of hydrogen peroxide in hypoxia-induced erythropoietin production. *Biochem. J.* **303**, 507-510.

- FRADETTE, C., BLEAU, A.M., PICHETTE, V., CHAURET, N. & DU SOUICH, P. (2002). Hypoxia changes the expression of CYP1A1/1A2 and 3A6 by a mechanism involving the release of serum mediators. *Br. J. Pharmacol.* **137**, 881-891.
- GIBSON, G.G., PLANT, N.J., SWALES, K.E., AYRTON, A. & EL-SANKARY, W. (2002). Receptor-dependent transcriptional activation of cytochrome P4503A genes: induction mechanisms, species differences and interindividual variation in man. *Xenobiotica* **32**, 165-206.
- GOLDBERG, M.A., DUNNING, S.P. & BUNN, H.F. (1988). Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein *Science* **242**, 1412-1415.
- GOLDBERG, M.A. & SCHNEIDER, T.J. (1994). Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J. Biol. Chem.* **269**, 4355-4359.
- GOZAL, E., SIMAKAJORNBOON, N., DAUSMAN, J.D., XUE, Y.D., CORTI, M., EL-DAHR, S.S. & GOZAL, D. (1999). Hypoxia induces selective SAPK/JNK-2-AP-1 pathway activation in the nucleus tractus solitarii of the conscious rat. *J. Neurochem.* **73**, 665-674.
- HALAZONETIS, T.D., GEORGOPOULOS, K., GREENBERG, M.E. & LEDER, P. (1988). c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* **55**, 917-924.
- HAMPL, V., CORNFIELD D.N., COWAN, N.J. & ARCHER, S.L. (1995). Hypoxia potentiates nitric oxide synthesis and transiently increases cytosolic calcium levels in pulmonary artery endothelial cells. *Eur. Respir. J.* **8**, 515-522.
- HUR, E., CHANG, K.Y., LEE, E., LEE, S.K. & PARK, H. (2001). Mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1 α . *Mol. Pharmacol.* **59**, 1216-1224.
- KAWAMOTO, T., SUEYOSHI, T., ZELKO, I., MOORE, R., WASHBURN, K. & NEGISHI, M. (1999). Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6318-6322.

- KURDI, J., MAURICE, H., EL-KADI, A.O.S., ONG, H., DALKARA, S., BÉLANGER, P.M. & DU SOUCH, P. (1999). Effect of hypoxia alone or combined with inflammation and 3-methylcholanthrene on hepatic cytochrome P450 in conscious rabbits. *Br. J. Pharmacol.* **128**, 365-373.
- LEHMANN, J.M., MCKEE, D.D., WATSON, M.A., WILLSON, T.M., MOORE, J.T. & KLIEWER, S.A. (1998). The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J. Clin. Invest.* **102**, 1016-1023.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- MARKOVAC, J. & GOLDSTEIN, G.W. (1988). Picomolar concentrations of lead stimulate brain protein kinase C. *Nature* **334**, 71-73.
- MICHIELS, C., ARNOULD, T. & REMACLE, J. (2000). Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1497**, 1-10.
- MOORE, L.B., PARKS, D.J., JONES, S.A., BLEDSOE, R.K., CONSLER, T.G., STIMMEL, J.B., GOODWIN, B., LIDDLE, C., BLANCHARD, S.G., WILLSON, T.M., COLLINS, J.L. & KLIEWER, S.A. (2000). Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J. Biol. Chem.* **275**, 15122-15127.
- NAKAYAMA, K., SUDO, Y., SASAKI, Y., IWATA, H., TAKAHASHI, M. & KAMATAKI, T. (2001). Studies on transcriptional regulation of CYP3A16 gene in mouse livers by application of direct DNA injection method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 820-824.
- NORRIS, M.L. & MOLLHORN, D.E. (1995). Hypoxia-induced protein binding to O₂-responsive sequences on the tyrosine hydroxylase gene. *J. Biol. Chem.* **270**, 23774-23779.
- PREMKUMAR, D.R., ADHIKARY, G., OVERHOLT, J.L., SIMONSON, M.S., CHERNIACK, N.S. & PRABHAKAR, N.R. (2000). Intracellular pathways linking hypoxia to activation of c-fos and AP-1. *Adv. Exp. Med. Biol.* **475**, 101-109.

- QUATTROCHI, L.C. & GUZELIAN, P.S. (2001). CYP3A regulation: from pharmacology to nuclear receptors. *Drug Metab. Dispos.* **29**, 615-622.
- RAMESH, G.T., MANNA, S.K., AGGARWAL, B.B. & JADHAV, A.L. (1999). Lead activates nuclear transcription factor-kappaB, activator protein-1, and amino-terminal c-Jun kinase in pheochromocytoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **155**, 280-286.
- RICHARD, D.E., BERRA, E. & POUYSSEGUR, J. (1999). Angiogenesis: how a tumor adapts to hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266**, 718-722.
- SALCEDA, S., BECK, I., SRINIVAS, V. & CARO, J. (1997). Complex role of protein phosphorylation in gene activation by hypoxia. *Kidney Int.* **51**, 556-559.
- SALNIKOW, K., KLUZ, T., COSTA, M., PIQUEMAL, D., DEMIDENKO, Z.N., XIE, K. & BLAGOSKLONNY, M.V. (2002). The regulation of hypoxic genes by calcium involves c-Jun/AP-1, which cooperates with hypoxia-inducible factor 1 in response to hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1734-1741.
- SEGLEN, P.O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell. Biol.* **13**, 29-83.
- SEMENZA, G.L. (2000). HIF-1: mediator of physiological and pathological responses to hypoxia. *J. Appl. Physiol.* **88**, 1474-1480.
- SEMENZA, G.L. (1999a). Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **15**, 551-578.
- SEMENZA, G.L. (1999b). Perspectives on oxygen sensing. *Cell* **98**, 281-284.
- SILVA, J.M. & NICOLL-GRIFFITH, D.A. (2001). *In vitro* models for studying induction of cytochromes P450 enzymes. In *Drug-drug Interactions*. pp199-201. ed. Rodrigues, A.D. pp.199-201. New York: Marcel Dekker.
- SUEYOSHI, T. & NEGISHI, M. (2001). Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 123-143.
- SULTANA, C., SHEN, Y., JOHNSON, C. & KALRA, V.K. (1999). Cobalt chloride-induced signaling in endothelium leading to the augmented adherence of sickle red blood cells and transendothelial migration of monocyte-like HL-60 cells is blocked by PAF-receptor antagonist. *J. Cell. Physiol.* **179**, 67-78.

- WANG, G.L., JIANG, B.H. & SEMENZA, G.L. (1995). Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 669-675.
- WENGER, R.H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *F.A.S.E.B. J.* **16**, 1151-1162.

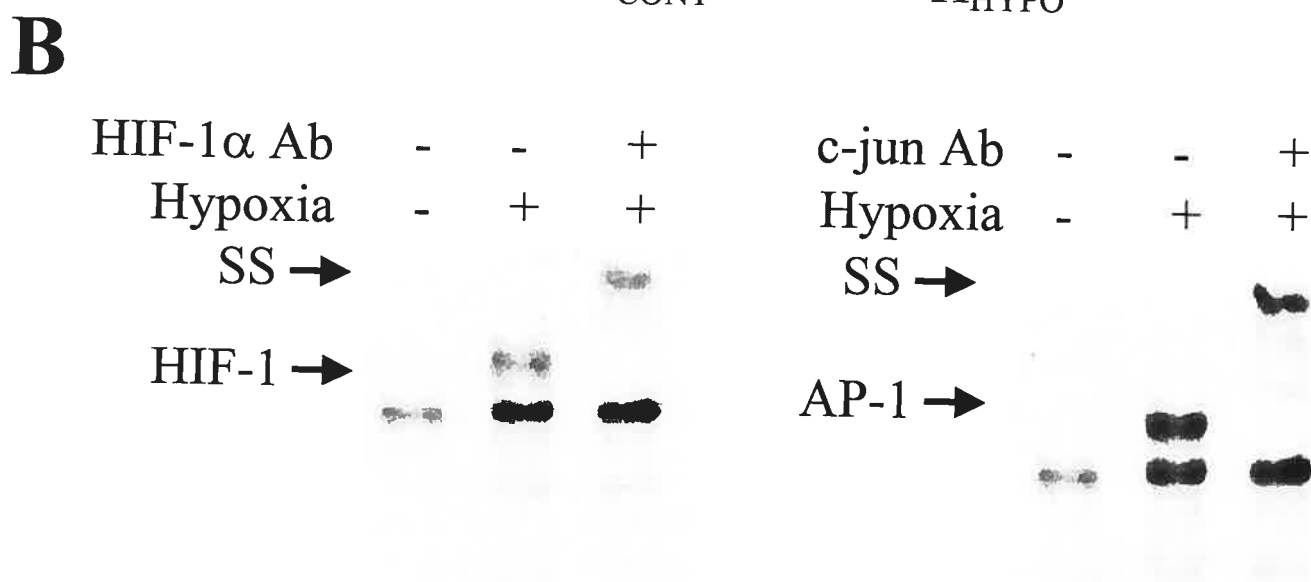
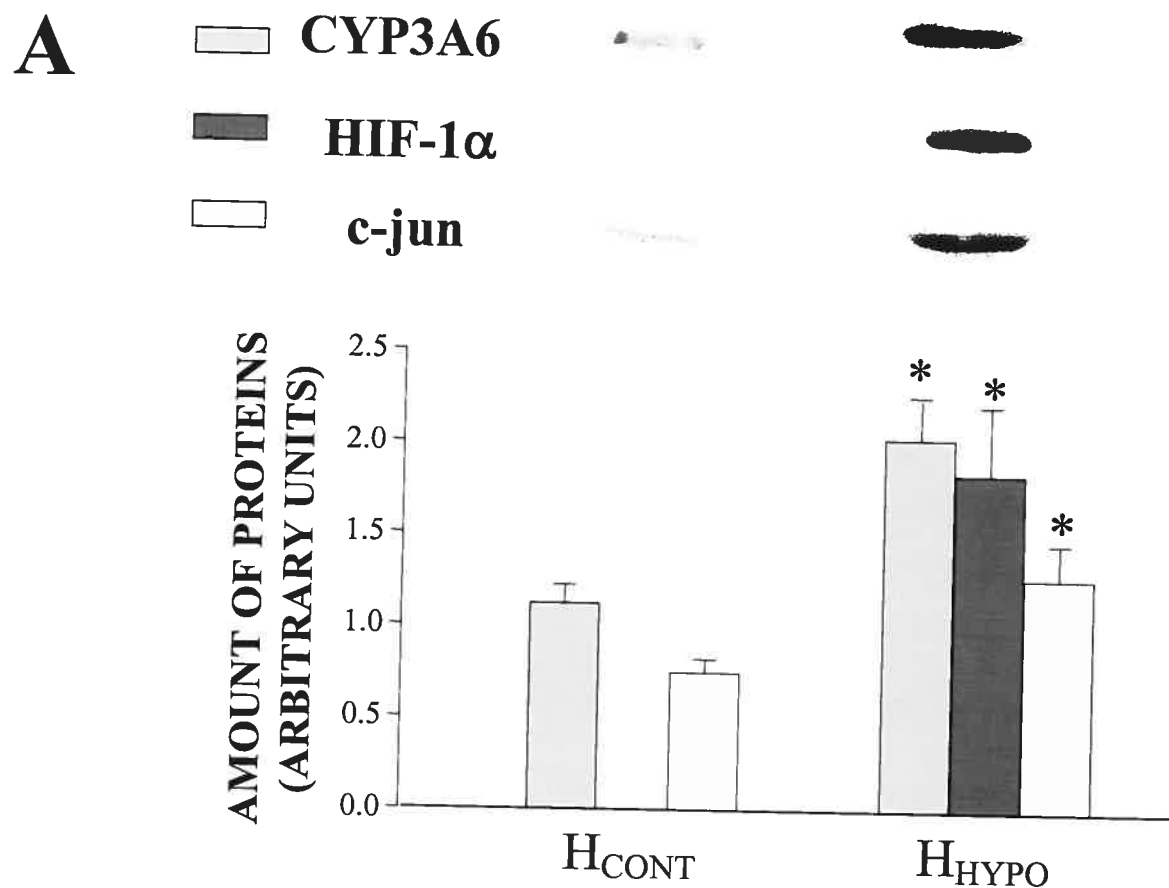


Figure 7.1 Effect of moderate hypoxia for 48 h *in vivo* on CYP3A6, HIF-1α and c-jun expression in rabbit hepatocytes, and HIF-1 and AP-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe. **A)** Average amounts of CYP3A6, HIF-1α and c-jun in hepatocytes from control (H_{CONT}) and from rabbits with moderate hypoxia (H_{HYPO}), and representative blots of these proteins. **B)** Analysis of HIF-1 and AP-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe by electrophoretic mobility shift assay in H_{CONT} and H_{HYPO}, and supershift analysis (SS) of HIF-1 and AP-1 in H_{HYPO}. Vertical bars are SEM. * *p*<0.05 compared with H_{CONT}.

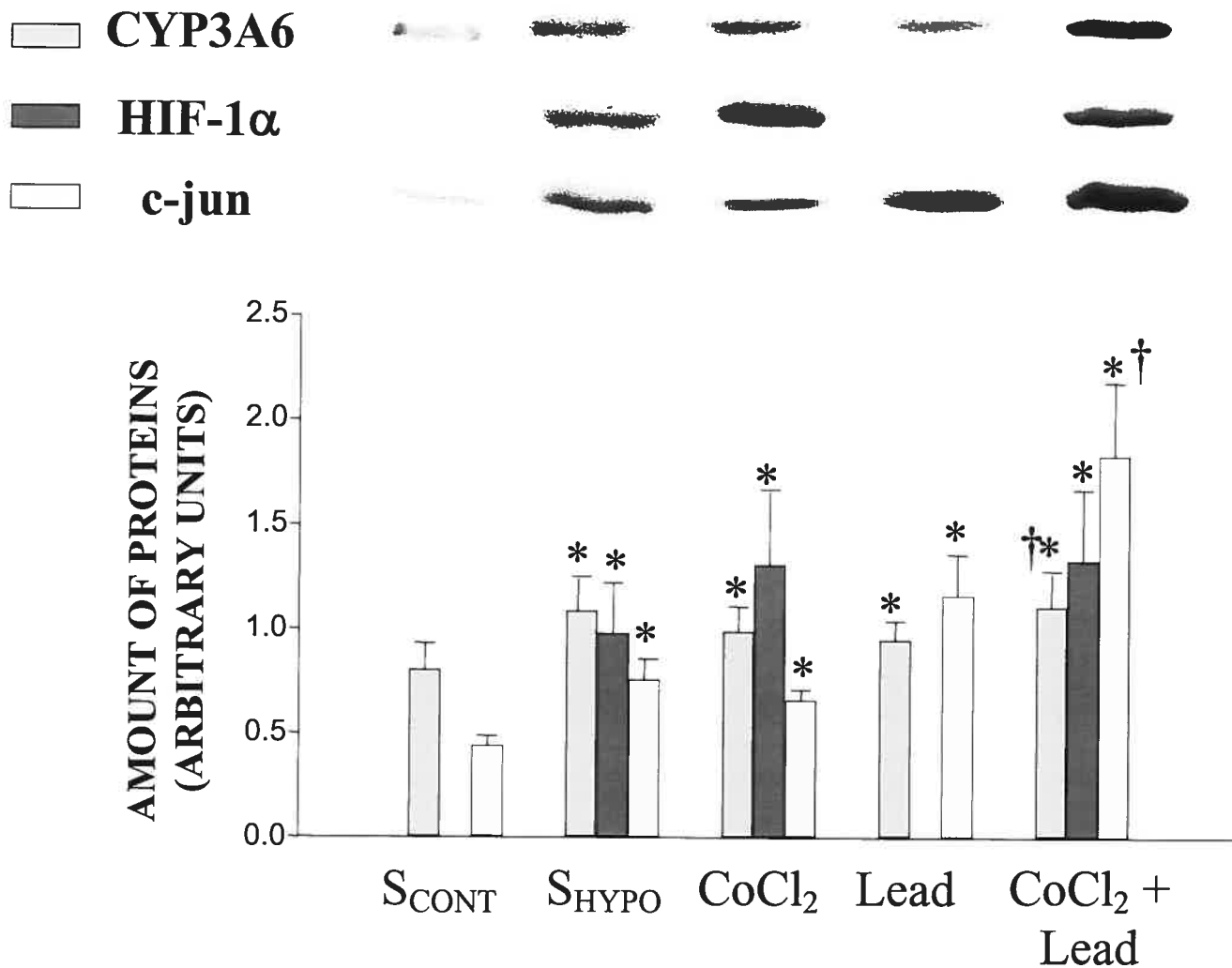


Figure 7.2 Average amounts of CYP3A6, HIF-1α and c-jun in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) incubated for 24 h with serum from rabbits with moderate hypoxia (S_{HYPO}), CoCl_2 and lead acetate, representative blots of these proteins. Vertical bars are SEM. *, \dagger $p < 0.05$ compared with S_{CONT} and CoCl_2 and lead, respectively.

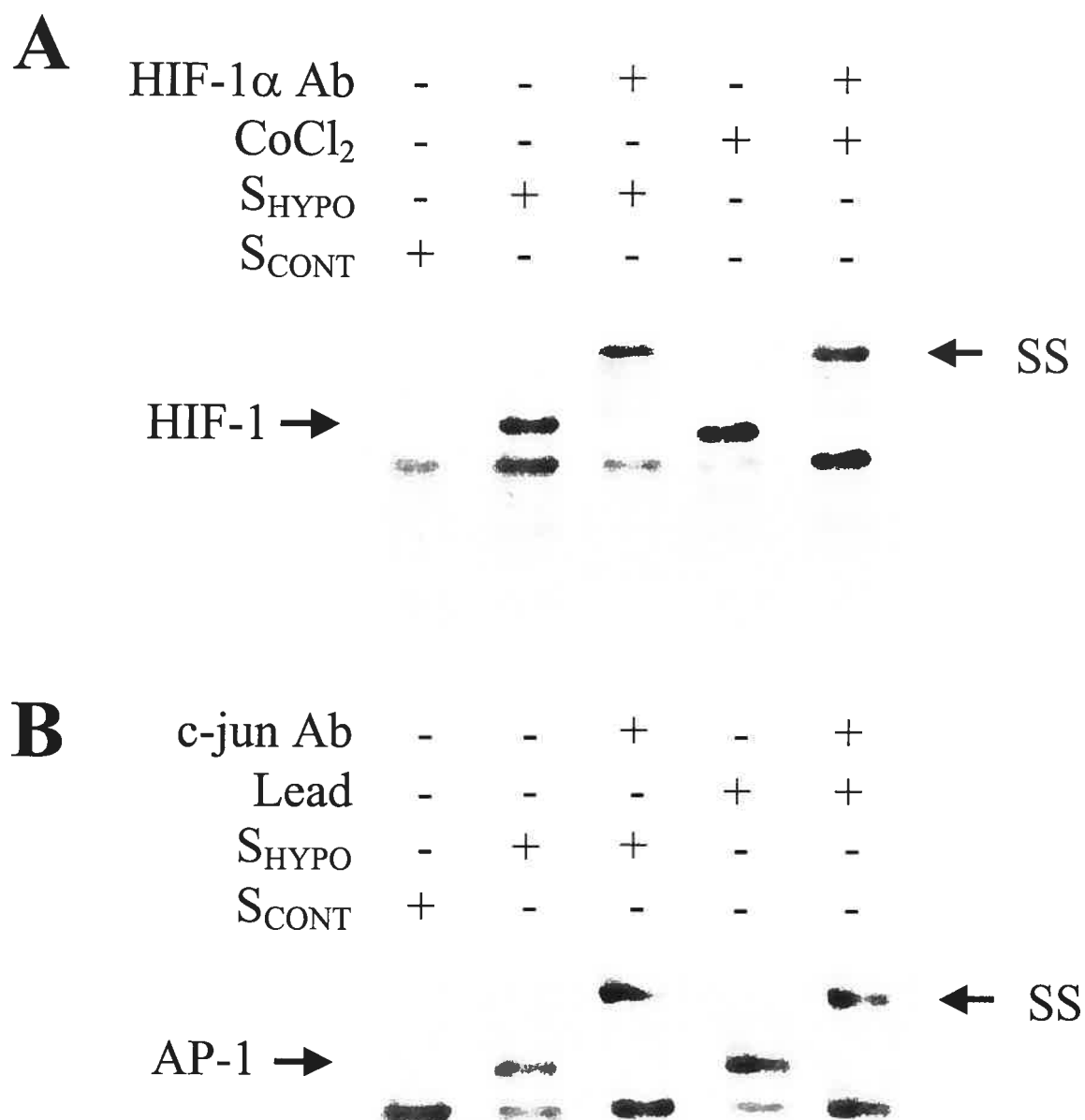
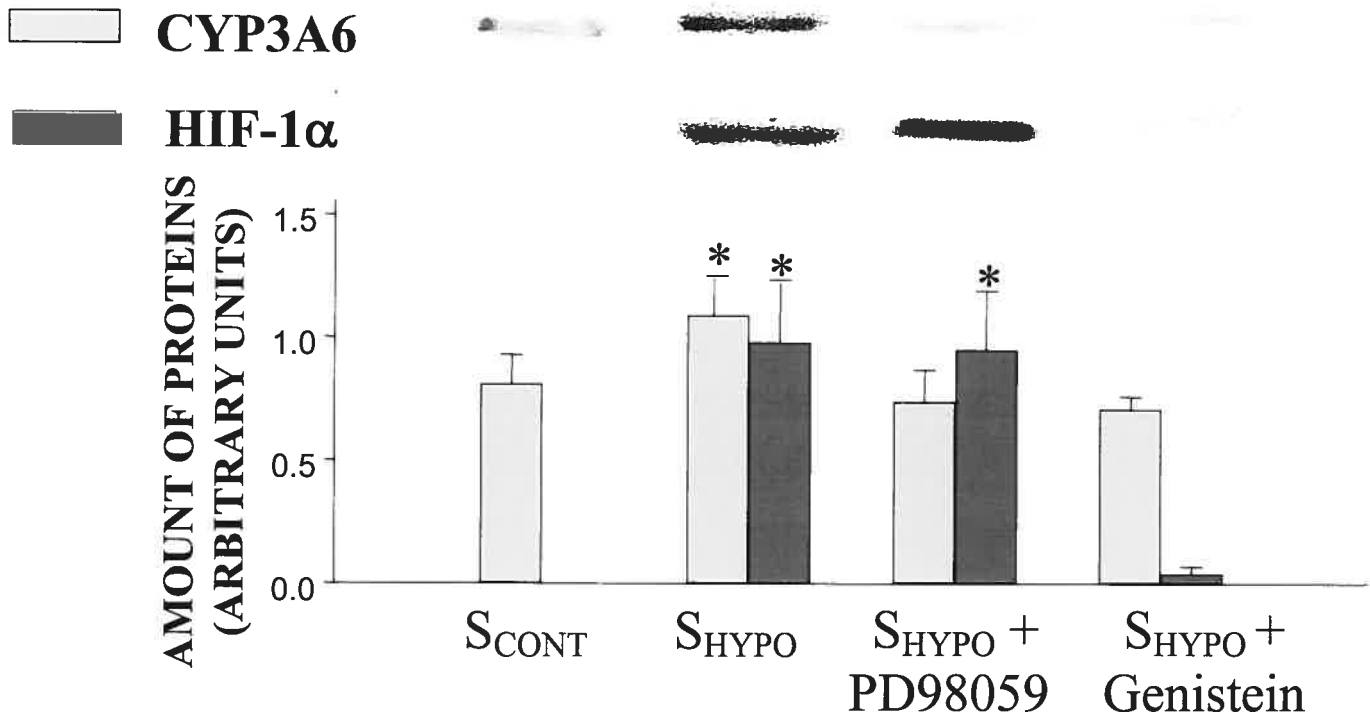


Figure 7.3 Effect of serum from control rabbits (S_{CONT}) and from rabbits with moderate hypoxia (S_{HYP}O), CoCl₂ (panel A), and lead acetate (panel B) on HIF-1 and AP-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe. SS indicates supershift analysis.

A

155



B

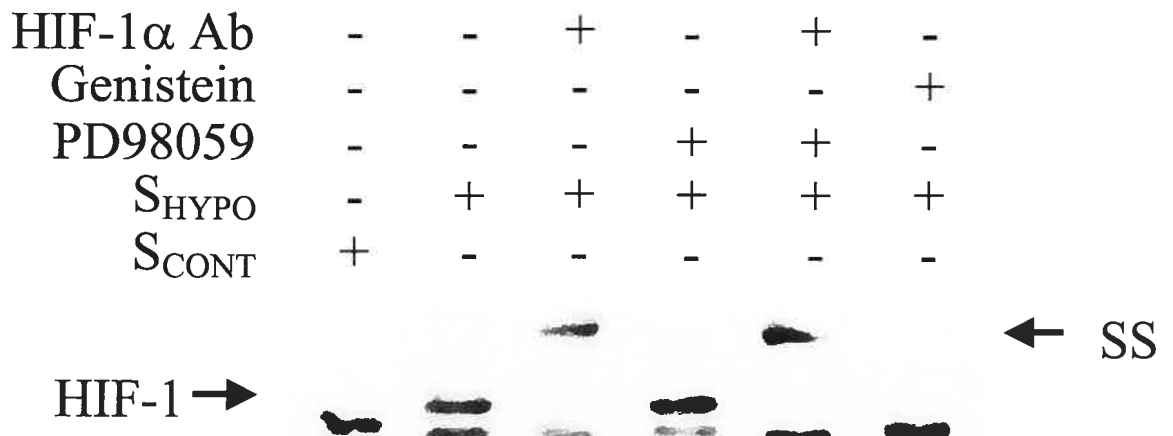


Figure 7.4 Effect of serum on CYP3A6 and HIF-1α expression, and HIF-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe in presence of protein kinase inhibitors. **A)** Average amount of CYP3A6 and HIF-1α following incubation of hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) with serum from control rabbits (S_{CONT}), serum from rabbits with moderate hypoxia (S_{HYP}O), S_{HYP}O + PD98059 and S_{HYP}O + genistein, and representative blots of CYP3A6 and HIF-1α. H_{CONT} were preincubated with PD98059 (100 μM) and genistein (150 μM) for one hour. **B)** Effect of S_{HYP}O, PD98059 and genistein on HIF-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe by electrophoretic mobility shift assay, and supershift analysis (SS) of HIF-1. Vertical bars are SEM. * p<0.05 compared with S_{CONT}.

A
 **CYP3A6**
 **HIF-1 α**

AMOUNT OF PROTEINS
(ARBITRARY UNITS)

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0

 H_{CONT} CoCl_2 $\text{CoCl}_2 +$
PD98059 $\text{CoCl}_2 +$
Genistein**B**HIF-1 α Ab

Genistein

PD98059

 CoCl_2 S_{CONT}

-

-

+

-

+

-

-

-

-

-

-

+

-

-

-

+

+

-

-

+

+

+

+

+

+

-

-

-

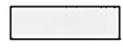
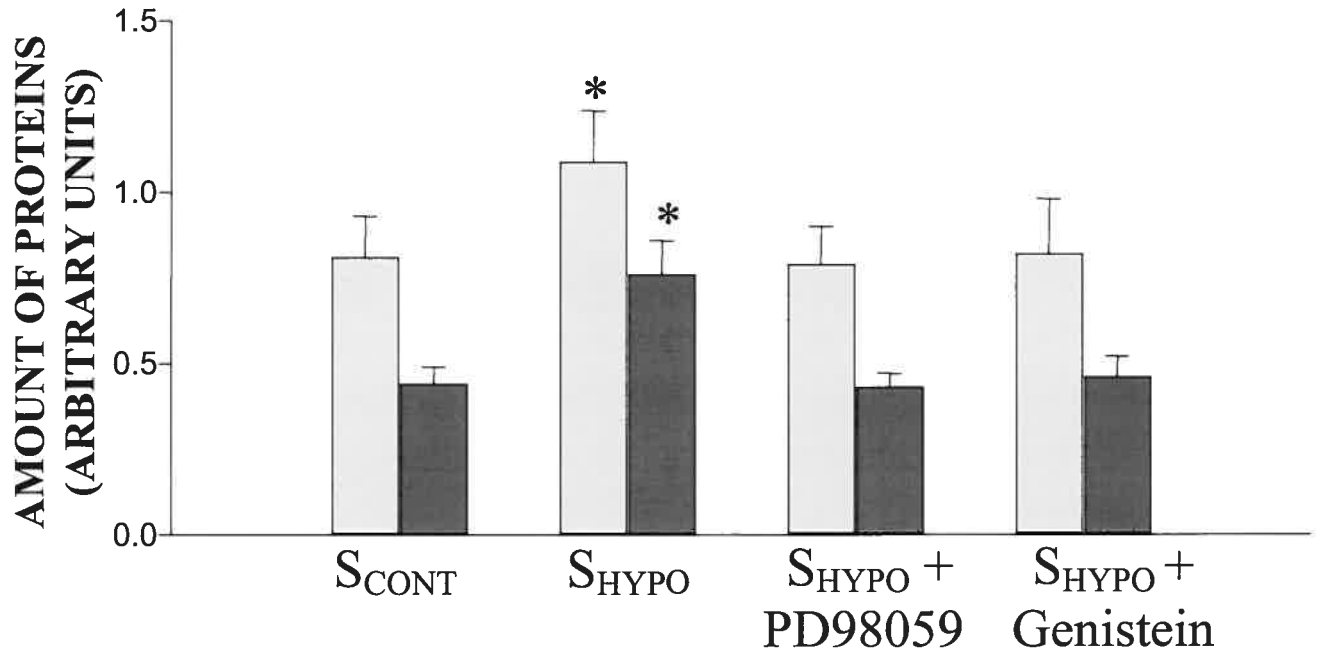
-

-

HIF-1 →

← SS

Figure 7.5 Effect of CoCl_2 on CYP3A6 and HIF-1 α expression and HIF-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe in presence of protein kinase inhibitors. **A)** Average amount of CYP3A6 and HIF-1 α following incubation of hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) with serum from control rabbits (S_{CONT}), CoCl_2 , $\text{CoCl}_2 + \text{PD98059}$ and $\text{CoCl}_2 + \text{genistein}$, and representative blots of CYP3A6 and HIF-1 α . H_{CONT} were preincubated with PD98059 (100 μM) and genistein (150 μM) for one hour. **B)** Effect of CoCl_2 , PD98059 and genistein on HIF-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe by electrophoretic mobility shift assay, and supershift analysis (SS) of HIF-1. Vertical bars are SEM. * $p < 0.05$ compared with S_{CONT} .

A**CYP3A6****c-jun****B**

c-jun Ab	-	-	+	-	-
Genistein	-	-	-	-	+
PD98059	-	-	-	+	-
S_{HYPO}	-	+	+	+	+
S_{CONT}	+	-	-	-	-



Figure 7.6 Effect of serum on CYP3A6 and c-jun expression, and AP-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe in presence of protein kinase inhibitors. **A)** Average amount of CYP3A6 and c-jun following incubation of hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) with serum from control rabbits (S_{CONT}), serum from rabbits with moderate hypoxia (S_{HYPO}), $S_{HYPO} + PD98059$ and $S_{HYPO} + genistein$, and representative blots of CYP3A6 and c-jun. H_{CONT} were preincubated with PD98059 (100 μM) and genistein (150 μM) for one hour. **B)** Effect of S_{HYPO} , PD98059 and genistein on AP-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe by electrophoretic mobility shift assay, and supershift analysis (SS) of AP-1. Vertical bars are SEM. * $p < 0.05$ compared with S_{CONT} .

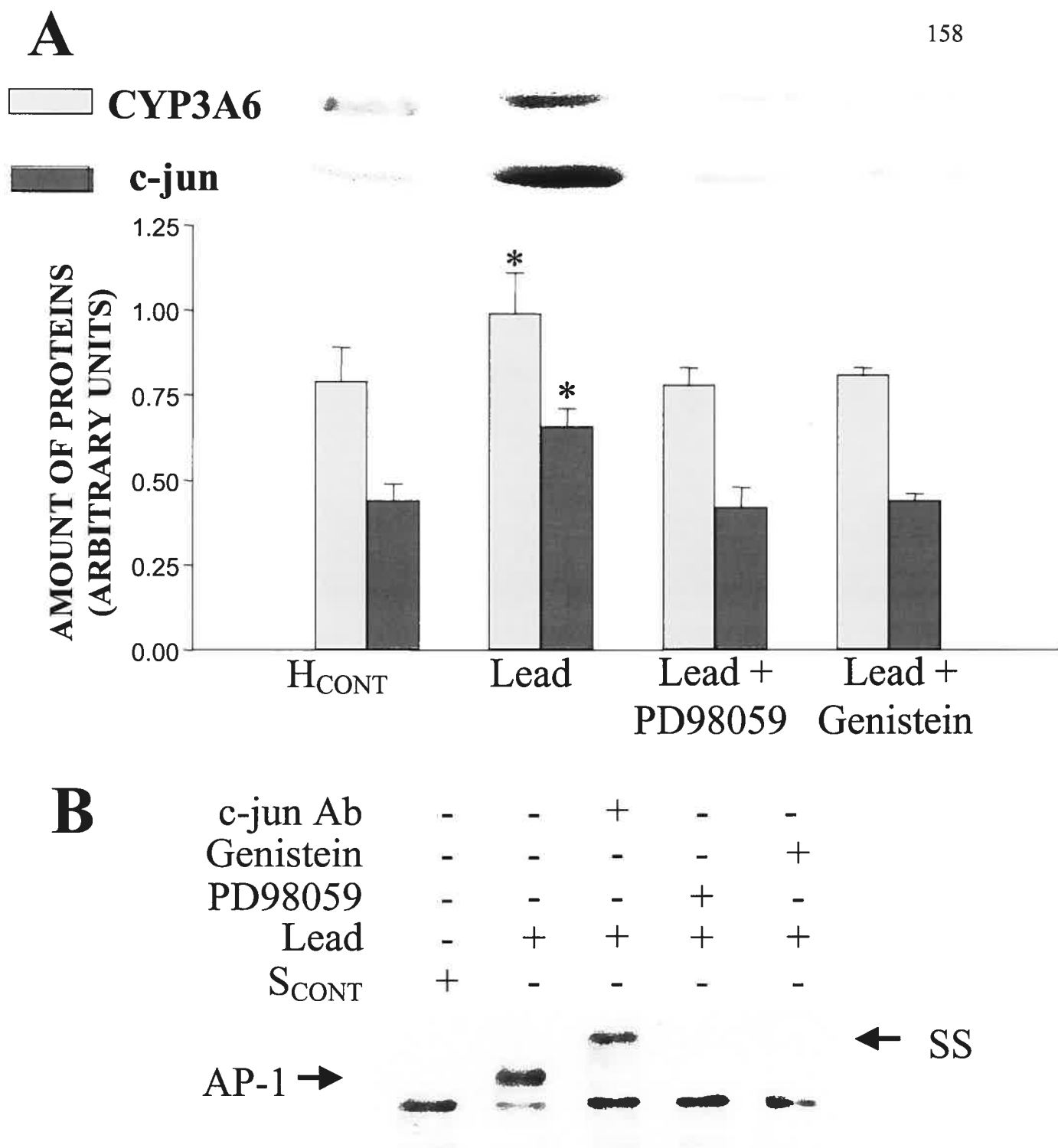


Figure 7.7 Effect of lead acetate on CYP3A6 and c-jun expression, and AP-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe in presence of protein kinase inhibitors. **A**) Average amount of CYP3A6 and c-jun following incubation of hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}) with serum from control rabbits (S_{CONT}), lead, lead + PD98059 and lead + genistein, and representative blots of CYP3A6 and c-jun. H_{CONT} were preincubated with PD98059 (100 μ M) and genistein (150 μ M) for one hour. **B**) Effect of lead, PD98059 and genistein on AP-1 binding to CYP3A6 oligonucleotide probe by electrophoretic mobility shift assay, and supershift analysis (SS) of AP-1. Vertical bars are SEM. * $p < 0.05$ compared with S_{CONT}.

A

CAR

PXR

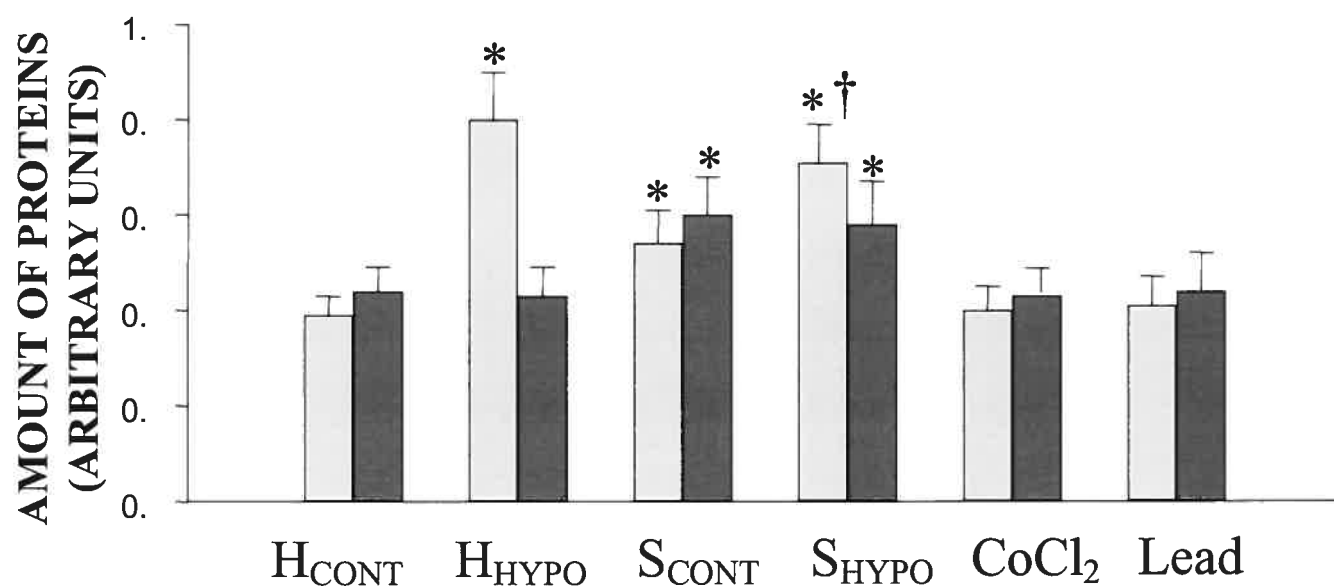
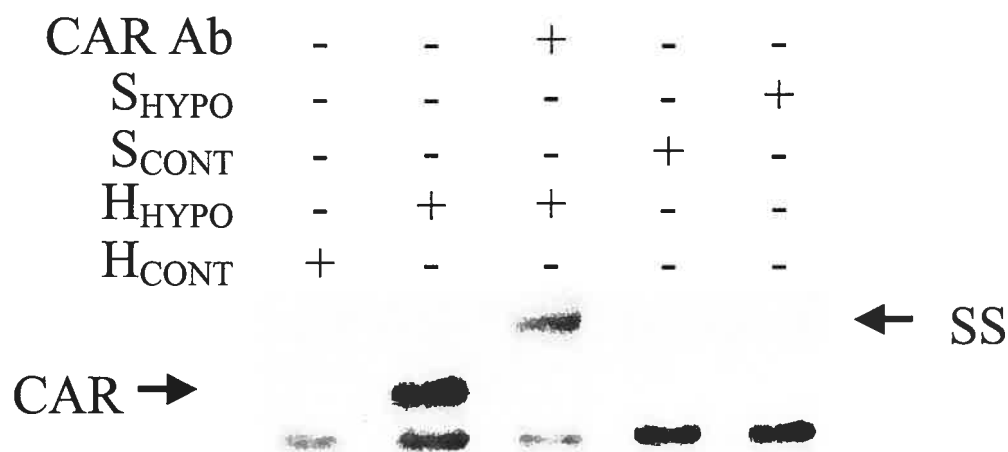
**B**

Figure 7.8 Effect of hypoxia *in vivo* and of serum from rabbits with moderate hypoxia (S_{HYPO}) on constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR) expression, and CAR binding to CYP3A6 oligonucleotide probe. **A**) Average amount of CAR and PXR in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}), hepatocytes from rabbits with moderate hypoxia (H_{HYPO}), and in H_{CONT} incubated with serum from control rabbits (S_{CONT}), S_{HYPO}, CoCl₂ and lead acetate, and representative blots of CAR and PXR. **B**) Effect of moderate hypoxia *in vivo* and S_{HYPO} on CAR binding to CYP3A6 oligonucleotide probe by electrophoretic mobility shift assay, and supershift analysis (SS) of CAR. Vertical bars are SEM. *, † p<0.05 compared with H_{CONT} and S_{CONT}, respectively.

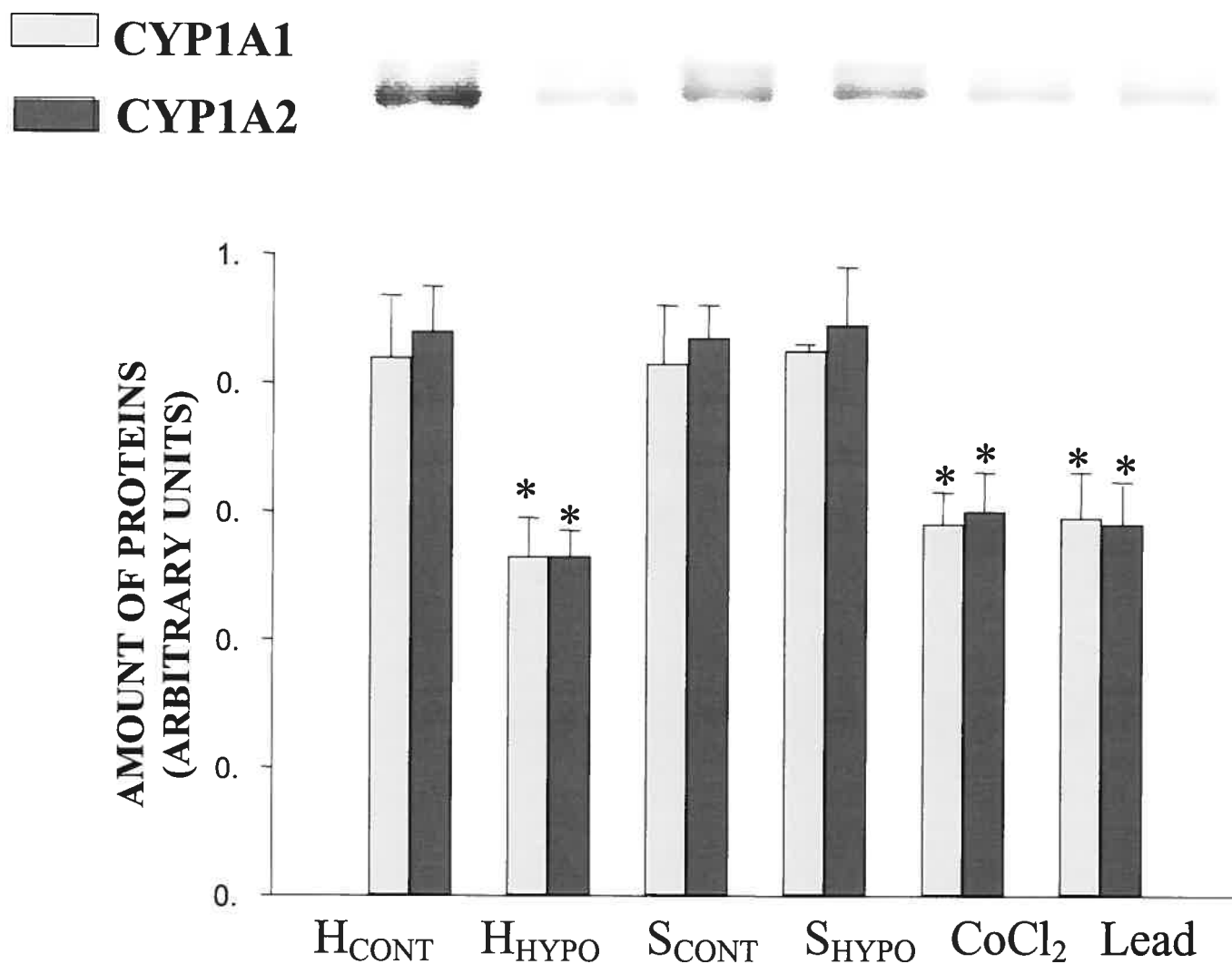


Figure 7.9 Average amount of CYP1A1 and CYP1A2 in hepatocytes from control rabbits (H_{CONT}), from rabbits with moderate hypoxia (H_{HYPO}), and in H_{CONT} incubated for 24 h with serum from control rabbits (S_{CONT}) and from rabbits with moderate hypoxia (S_{HYPO}), with CoCl₂, and with lead acetate and representative blots of CYP1A1 and CYP1A2. Vertical bars are SEM. * p < 0.05 compared with H_{CONT}.

CHAPITRE 8

SEROTONIN IS BIOTRANSFORMED BY CYP2C9, 2C19 AND 2B6 TO HYDROXYLAMINE WHICH IS CONVERTED INTO NITRIC OXIDE

Caroline Fradette, Nobuharu Yamaguchi and Patrick du Souich

British Journal of Pharmacology (2003) sous presse.

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montréal,
Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

Abstract

1 There is circumstantial evidence suggesting that 5-hydroxytryptamine could be biotransformed by enzymatic systems other than monoamino oxidase A, and that the isoforms of cytochrome P450 may be a source of nitric oxide. This study aimed to assess whether cytochrome P450 contributes to 5-hydroxytryptamine biotransformation and to provide evidence that 5-hydroxytryptamine metabolism generates nitric oxide.

2 Addition of 5-hydroxytryptamine to cultured hepatocytes yielded 5-hydroxyindol acetic acid, formation modulated by cytochrome P450 enzyme inducers and inhibitors. Recombinant human CYP2B6, 2C9 and 2C19 biotransformed 5-hydroxytryptamine in 5-hydroxyindol acetic acid, but not CYP1A2, 2D6 or 3A4.

3 Cultured hepatocytes with 5-hydroxytryptamine generated nitric oxide, the amount of which was altered by cytochrome P450 enzyme inducers and inhibitors. In presence of CYP2B6, 2C9 and 2C19, 5-hydroxytryptamine relaxed precontracted isolated aortic rings, with or without endothelium, effect prevented by the addition of methylene blue and an inhibitor of catalase, but not by myoglobin. In absence of catalase, hydroxylamine was always assayed as a by-product of 5-hydroxytryptamine metabolism.

4 In conclusion, CYP2B6, 2C9 and 2C19 biotransform 5-hydroxytryptamine yielding hydroxylamine which is converted to nitric oxide in presence of catalase.

Keywords: Cytochrome P450, 5-hydroxytryptamine, nitric oxide, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, hydroxylamine, hepatocytes

Abbreviations: 3-AT 3-amino-1,2,4-triazole; EDHF endothelium-derived hyperpolarizing factor; EETs epoxyecosatrienoic acids; H_2O_2 hydrogen peroxide; HETE hydroxyeicosatetranoic acid; diHETEs dihydroxyeicosatetraemoic acids; 5-HIAA 5-hydroxyindole acetic acid; 5-HT 5-hydroxytryptamine or 5-hydroxytryptamine; KTZ ketoconazole; L-Arg L-arginine; L-NAME N,G-nitro-L-arginine methyl ester; MAO A monoamine oxidase A; NO^\bullet nitric oxide; NOS2 nitric oxide synthase 2; OME omeprazole; PB Phenobarbital; PE phenylephrine; PEITC β -phenylethyl isothiocyanate; RIF rifampicin; SNP sodium nitroprussiate.

Introduction

There is clear evidence that the isoforms of the cytochrome P450 (P450) superfamily are implicated in the formation of vasoactive substances, primarily through the biotransformation of arachidonic acid (Capdevila *et al.*, 1981). Enzymes of the CYP4A, 4B and 4F subfamilies catalyse the ω -hydroxylation of fatty acids, and enzymes of the CYP1A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2J, 3A and 4A subfamilies catalyse the formation of epoxyecosatrienoic acids (EETs) (Roman, 2002). An endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF), the 11,12-EET is a metabolite of arachidonic acid synthesized by CYP2C8/34 (Fisstahler *et al.*, 1999). Enzymes of the P450 have also been implicated in the formation of nitric oxide (NO[•]), particularly the CYP3A subfamily (Boucher *et al.*, 1992).

5-Hydroxytryptamine (5-HT) is an effector on various types of tissue receptors. Contraction of blood vessels to 5-HT is mediated by smooth muscle 5-HT_{1B/1D} and/or 5-HT_{2A} receptors (Saxena *et al.*, 1998). On the other hand, 5-HT is a vasodilator. The vasodilatation elicited by 5-HT is mediated by endothelial 5-HT receptors (Glusa & Pertz, 2000) and smooth muscle 5-HT receptors that appear coupled to endothelial cells to release NO[•] (Mylecharane, 1990; Bruning *et al.*, 1993). However, the role of NO[•] remains questionable because 5-HT-induced relaxation is not inhibited by rubbing the endothelium or by NG-nitro-L-arginine, a nitric oxide synthase inhibitor (Tsuru *et al.*, 1998).

5-HT is believed to be primarily metabolised by monoamine oxidase A (MAO A) which deaminates 5-HT yielding 5-hydroxyindole acetaldehyde that is converted to 5-

hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) by an aldehyde dehydrogenase. However, there is indirect data suggesting that 5-HT may also be biotransformed by other enzymatic systems. Metyrapone and ketoconazole show an antidepressant profile (Healy *et al.*, 1999; Murphy, 1997), possibly associated with enhanced postsynaptic response to 5-HT (Kennett *et al.*, 1985). Moreover, in rats, metyrapone treatment increases 5-HT and its metabolites in the brain (Leret *et al.*, 1998). Since metyrapone (Hildebrandt, 1972) and ketoconazole (Lomaestro & Piatek, 1998) are known P450 enzyme inhibitors, we speculated that besides MAO A, 5-HT is biotransformed by enzymes of the P450. Supporting such hypothesis, it has been shown *in vitro* that 5-HT inhibits the oxidase activity of CYP1A2, CYP2C9 and CYP3A4 (Gervasini *et al.*, 2001). On the other hand, to explain why rubbing the endothelium and NG-nitro-L-arginine do not prevent 5-HT relaxation (Tsuru *et al.*, 1998), we hypothesized that deamination of 5-HT by P450 generates NO[•]. By combining experiments conducted in hepatocytes, human recombinant P450 isoforms, and in aortic rings we demonstrate that 5-HT is biotransformed by CYP2B6, CYP2C9 and CYP2C19 to hydroxylamine, which in presence of catalase generates nitric oxide.

Methods

Biotransformation of 5-hydroxytryptamine by P450 isoforms

Animals and hepatocyte collection

Male New Zealand rabbits (1.8-2.2 Kg, Charles Rivers, St-Constant, Québec) were maintained on Purina Laboratory Chow and water *ad libitum* for at least 7 days before any experimental work was undertaken. All the experiments were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for use of laboratory animals. Hepatocytes were isolated according to the two-step liver perfusion method of Seglen (1976) with minor modifications (El-Kadi *et al.*, 1997). Viability was assessed by trypan blue exclusion to ensure that it was greater than 90%. Cell concentration was adjusted to 1×10^6 per ml.

Experimental protocols

Hepatocytes were incubated for 72 h with cytochrome P450 enzyme inducers, rifampicin (RIF, 5-25 μ M) and phenobarbital (PB, 50-200 μ M), and enzyme inhibitors, such as ketoconazole (KTZ, 10-50 μ M), omeprazole (OME, 10-50 μ M), and β -phenylethyl isothiocyanate (PEITC, 10-50 μ M), with the nitric oxide synthase inhibitor N,G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 0.1-1 mM), and with the MAO A inhibitor chlorgyline (10-50 μ M). Four hours before ending the incubation period, e.g. at 68 h, L-arginine (L-Arg, 0.1-1 mM) and 5-HT (10-125 μ M) were added. Finally, following the 72 h incubation period, 5-HT biotransformation, protein expression of CYP1A1/1A2, CYP2B6, CYP2C9/2C19, CYP3A6, and nitric oxide synthase 2 (NOS2), as well as NO[•] concentration were documented.

Human recombinant P450 isoforms CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4 were incubated with 5-HT (10-125 μ M) and the P450 inhibitors in presence of a NADPH regenerating system as described elsewhere (Projean *et al.*, 2003) for 55 minutes, and 5-HT, 5-HIAA, NO[•], and hydroxylamine were assayed.

Western blot analysis

The amount of proteins in hepatocytes was measured in cell lysates (Lowry *et al.*, 1951). For Western blot analysis, 40 μ g of cell lysate were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis as described elsewhere (Fradette *et al.*, 2002). CYP1A1 and 1A2 were detected with a polyclonal anti-rabbit CYP1A1 (Oxford Biochemical Research, Oxford, MI, U.S.A.) and visualized with an alkaline phosphatase conjugated secondary antibody using nitro blue tetrazolium as substrate. Specific antibodies against CYP3A6 (Oxford Biochemical Research, Oxford, MI, U.S.A.), CYP2B6, CYP2C9/2C19 (Research Diagnostics, Inc., Flanders, NJ), and NOS2 (BD Transduction Laboratories, Mississauga, Canada) were used and identified with a secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase enzyme, and visualized by autoradiography. All antibodies had cross reactivity for rabbit proteins. Western blot results were normalized with a protein sample to allow for comparisons between measurements. Intensity of the bands was quantified with the software Un-Scan-It-Gel (Silk Scientific Inc., Orem, Utah) and are presented in arbitrary units.

5-HT and 5-HIAA assay

5-HT and its metabolite 5-HIAA were assayed in cells and recombinant P450 isoforms supernatants by high-performance liquid chromatography with an electrochemical detector as described by Yamaguchi (1993).

NO[•] and hydroxylamine assays

NO[•] was determined by converting nitrate into nitrite in the culture media, and total nitrite was assayed spectrophotometrically with the Griess reaction (Grisham *et al.*, 1996).

Hydroxylamine could only be assayed in absence of catalase, e.g. in experiments conducted with recombinant CYP2B6, CYP2C9 and CYP2C19 via a transglutaminase activity assay (Folk & Chung, 1985). The assay is based on the fact that transglutaminase catalyses the formation of hydroxamate from CBZ-glutaminyglycine and hydroxylamine at pH 6.0. Formed hydroxamate was measured spectrophotometrically at 525 nm.

Vasorelaxant activity of 5-HT by-product

Functional studies in isolated aortic rings

Functional studies with aortic rings were conducted as described elsewhere (Thollon *et al.*, 2002). Rings of thoracic aorta of Sprague-Dawley rats of approximately 2.5 mm in length were mounted under 2 g resting tension in the chamber bath. After equilibration, to test their ability to contract, rings were initially contracted with 100 nM phenylephrine (PE), followed by the addition of 1 μ M acetylcholine to test the presence

of the endothelium. After re-equilibration, 50 μM of ketanserin (5-HT receptor antagonist) were added, and 10 or 100 nM PE were used to generate a sustained tension in vessels without and with endothelium, respectively. Thereafter, 10-125 μM of 5-HT were added in the chamber bath. All experiments were conducted in the presence or absence of recombinant CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 (25 pM). Each experiment included a control relaxation with 1 μM sodium nitroprusside (SNP), a NO^{\bullet} donor.

To further characterize the nature of the relaxing agent, aortic rings were incubated with omeprazole (50 μM), methylene blue (30 μM), myoglobin (50 μM) and 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT, 50 mM). Tissues were precontracted with a 5 nM of PE. Since pretreatment with 3-AT depresses PE-induced tension by $32.2 \pm 2.4\%$ ($n = 6$), PE concentration was 30 nM.

Drugs and chemicals

All reagents, enzymes and substrates were purchased from Sigma Chemicals (Sigma, St. Louis, MO). Recombinant human P450 CYP1A2, CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP2B6 were purchased from Gentest (BD Biosciences Company, Woburn, MA).

Calculation of the maximal effect and statistical analysis

Predicted maximal concentration of NO^{\bullet} (C_{max}) generated by 5-HT was estimated from the dose-response curves by using the E_{max} model with a subroutine written in

FORTTRAN for the computer program WinNonlin (Scientific Consulting Inc., Apex, NC).

All results are presented as mean \pm s.e. Comparison of results from the various experimental groups and their corresponding controls was carried out by a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Newman-Keuls *post hoc* test. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Following 24 h incubation, hepatocytes from control rabbits expressed CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A6, as well as NOS2. After 72 h of incubation, NOS2 expression was almost undetectable. The time of incubation did not affect the expression of P450 isoforms (Figure 1a). Therefore, all the experiments reported herein were conducted with hepatocytes incubated for 72 h, e.g. in absence of NOS2. Incubation of hepatocytes for 72 h with the enzyme inducer RIF, increased the expression of CYP2C9 from 0.79 ± 0.12 to 0.98 ± 0.15 ($P < 0.05$), that of CYP2C19 from 0.95 ± 0.15 to 1.88 ± 0.15 ($P < 0.05$), and that of CYP2B6 from 0.55 ± 0.09 to 0.84 ± 0.08 ($P < 0.05$); PB, another enzyme inducer, increased the expression of CYP2C9 from 0.79 ± 0.12 to 1.59 ± 0.11 ($P < 0.05$), that of CYP2C19 from 0.95 ± 0.15 to 2.25 ± 0.21 ($P < 0.05$), and that of CYP2B6 from 0.55 ± 0.09 to 2.35 ± 0.11 ($P < 0.05$). Neither RIF nor PB affected NOS2 expression (Figure 1b).

Biotransformation of 5-HT

1. Rabbit's hepatocytes

In the supernatant of cultured hepatocytes, baseline concentrations of 5-HT and 5-HIAA were 0.045 ± 0.005 and 0.120 ± 0.007 μM , respectively ($n = 8$). The enzyme inducers RIF and PB increased dose dependently the production of 5-HIAA by 118 and 72% ($P < 0.05$), respectively, while 5-HT was decreased to undetectable level by both inducers ($n = 8$). On the other hand, KTZ, an unspecific P450 inhibitor, OME an inhibitor of CYP2C9 and 2C19, and PEITC an inhibitor of CYP2B6, reduced baseline concentrations of 5-HIAA by 42, 75 and 58% ($P < 0.05$, $n = 8$), respectively, whereas the concentrations of 5-HT increased by 167, 390 and 227% ($P < 0.05$, $n = 8$), respectively.

Chlorgyline, a specific inhibitor of MAO A, decreased dose-dependently 5-HIAA concentrations up to 15% baseline values.

In hepatocytes incubated with 5-HT (0-125 μ M), there was a dose-dependent increase in 5-HIAA production (Figure 2). The enzyme inducers RIF and PB increased dose dependently the production of 5-HIAA by around 50% ($P < 0.05$, $n = 8$), and slightly reduced 5-HT. On the other hand, KTZ, OME and PEITC reduced the concentrations of 5-HIAA by 10 to 30% and increased 5-HT concentrations by 10 to 50%. Finally, in hepatocytes incubated with increasing concentrations of 5-HT, chlorgyline reduced the formation of 5-HIAA by 79% (Figure 2).

2. Human recombinant P450 isoforms

Incubation of 5-HT (0-125 μ M) with human recombinant CYP2C9, CYP2C19 and CYP2B6 increased dose-dependently the concentrations of 5-HIAA to plateau at around 3.5 μ M with 5-HT concentrations of 100 μ M or higher. Human recombinant CYP1A2, CYP3A4 and CYP2D6 did not biotransform 5-HT to 5-HIAA. KTZ reduced the formation of 5-HIAA in CYP2C9, CYP2C19 and CYP2B6 by 54%, 52% and 55% ($P < 0.05$, $n = 8$), whereas OME and PEITC impeded 5-HIAA production almost completely (Figure 3).

NO[•] production

Mean baseline NO[•] concentration in 72 h hepatocytes was 0.28 ± 0.02 μ M. L-Arg and L-NAME did not affect baseline NO[•]. However, NO[•] concentrations were decreased dose-dependently by KTZ, OME, and PEITC up to 32, 18 and 23% baseline

values, respectively ($P < 0.05$, $n = 8$). In addition, chlorgyline reduced NO^\bullet concentrations by 21%. On the other hand, PB enhanced baseline NO^\bullet concentrations dose-dependently to a maximum increase of 316% ($P < 0.05$, $n = 4$). Predicted maximal effect or efficacy on baseline NO^\bullet concentrations (C_{\max}) of these enzyme inhibitors and inducers is depicted in Figure 4A.

In hepatocytes, 5-HT increased the concentration of NO^\bullet dose-dependently, and predicted C_{\max} reached $0.6 \mu\text{M}$. L-Arg and L-NAME did not modify the NO^\bullet concentrations or predicted C_{\max} in hepatocytes incubated with 5-HT. On the other hand, chlorgyline, KTZ, OME and PEITC reduced the production of NO^\bullet induced by 5-HT, as well as predicted C_{\max} of NO^\bullet . Finally, the enzyme inducers RIF and PB increased the concentrations of NO^\bullet generated by 5-HT, as well as predicted C_{\max} of NO^\bullet (Figure 4B).

Dynamic studies

Vasorelaxant effect of 5-HT metabolite

Preliminary experiments confirmed that in rat aorta rings with endothelium, $50 \mu\text{M}$ of 5-HT produced a spontaneous contraction of 197% ($n = 6$). However, when 5-HT ($50 \mu\text{M}$) was incubated in presence of $50 \mu\text{M}$ ketanserin the precontracted aorta ring showed a discrete relaxation of 11% ($P = 0.07$; $n = 6$). Interestingly, in presence of ketanserin, the mild relaxation elicited by 5-HT was totally abolished in endothelium-denuded aorta rings ($n = 6$). Chlorgyline ($25 \mu\text{M}$) did not modify the ability of 5-HT to induce a relaxation of the precontracted rat aorta ring.

In rat aorta rings with endothelium precontracted by PE (1.6 ± 0.1 g), 50 μ M of 5-HT produced a powerful relaxation in presence of human recombinant CYP2C9, CYP2C19 and CYP2B6, reaching a maximal relaxation of around 95% ($n = 6$). The relaxation generated by 5-HT in presence of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2B6 was abolished by 50 μ M of omeprazole ($n = 3$). The presence of CYP1A2, CYP3A4 or CYP2D6 did not induce any relaxation. In endothelium-denuded segments, a lower concentration of PE (10 nM) was required to induce a tension similar to that produced in endothelium-containing segments (1.55 ± 0.12 g), and a greater concentration of 5-HT (75 μ M) was necessary to produce maximal relaxations of around 95% ($n = 6$) (Figure 5a). The addition of CYP1A2, CYP3A4 or CYP2D6 did not produce relaxation. SNP induced a 100% relaxation of precontracted aorta rings with and without endothelium ($n = 6$).

Characterization of the mechanism underlying the vasorelaxation induced by 5-HT

Myoglobin (NO^\bullet scavenger) added to the medium containing CYP2C9, CYP2C19 and CYP2B6, abolished SNP-induced relaxation of PE precontracted aorta rings. In contrast, myoglobin did not affect the vasorelaxation elicited by 5-HT ($n = 6$) (Figure 5b). On the other hand, the relaxation induced by both SNP and 5-HT was abolished by methylene blue, an inhibitor of soluble guanylate cyclase (Figure 5c). These results suggested that the vasorelaxant factor produced by 5-HT is not NO^\bullet but rather a by-product that has to be converted to NO^\bullet in the smooth muscle.

Assuming that the product resulting from 5-HT deamination by CYP2C9, CYP2C19 and CYP2B6 was hydroxylamine (NH_2OH) which is not scavenged by myoglobin (Taira et al., 1997), we hypothesised that hydroxylamine is transformed to NO^\bullet by catalase in presence of hydrogen peroxide (H_2O_2). Pretreatment of the aortic rings with the catalase inhibitor, 3-AT (Mian & Martin, 1995) almost completely abolished 5-HT-induced relaxations of PE precontracted endothelium-denuded rings, and that independently of the P450 isoforms present, e.g. CYP2C9, CYP2C19 and CYP2B6 ($n = 6$). As expected, 3-AT did not affect SNP-induced relaxation (Figure 5d).

When 5-HT was incubated with recombinant human P450 isoforms, NO^\bullet was not detected. Assuming that the product generated by P450 isoforms was hydroxylamine, recombinant human CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 were incubated with catalase (1000 U ml^{-1}) and H_2O_2 (1 mM), in the presence of a NADPH regenerating system and several concentrations of 5-HT. Under these experimental conditions, 5-HT generated dose-dependently NO^\bullet . With CYP2C9, predicted C_{max} of NO^\bullet was $2.04 \pm 0.07 \text{ } \mu\text{M}$ ($n = 7$), significantly greater ($P < 0.05$) than the predicted C_{max} for CYP2C19 and CYP2B6, e.g. 1.48 ± 0.04 and $1.30 \pm 0.10 \text{ } \mu\text{M}$, respectively ($n = 7$). In presence of catalase and H_2O_2 , CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4 did not generate NO^\bullet (data not shown). In presence of KTZ, the production NO^\bullet and predicted C_{max} was reduced to 0.496 ± 0.030 , 0.230 ± 0.014 and $0.132 \pm 0.016 \text{ } \mu\text{M}$ for CYP2C9, CYP2C19 and CYP2B6, respectively ($n = 7$, $P < 0.05$). On the other hand, OME and PEITC totally prevented the production of NO^\bullet by CYP2C9, CYP2C19 and CYP2B6.

To confirm that the by-product generated by P450 isoforms was hydroxylamine, recombinant human CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 were incubated without catalase and H_2O_2 , in the presence of the NADPH regenerating system, and several concentrations of 5-HT. Under these experimental conditions, hydroxylamine was generated dose-dependently only by CYP2B6, CYP2C9 and CYP2C19, and KTZ reduced its production, while OME and PEITC totally abrogated hydroxylamine production. There was a close relationship between the NO^\bullet produced by CYP2B6, CYP2C9 and CYP2C19 in presence of 5-HT and catalase, and the concentration of hydroxylamine assayed in absence of catalase (Figure 6).

Discussion

The above investigations provide evidence that P450 isoforms CYP2C9, CYP2C19 and CYP2B6 biotransform 5-HT generating 5-HIAA and NH_2OH which is converted to NO^\bullet by catalase. It has always been assumed that 5-HT is exclusively biotransformed by MAO A, however the present results demonstrate that several isoforms of the P450 contribute to 5-HT degradation. Incubation of hepatocytes with an IMAO A, chlorgyline, shows that P450 contributes with around 20% of the 5-HIAA produced. However, in presence of P450 inducers, rifampicin and phenobarbital, the contribution of P450 to 5-HIAA formation is similar to that of MAO A. Can 5-HT biotransformation by P450 occur in the central nervous system? Circumstantial evidence supports this eventuality. Firstly, CYP2C9, CYP2C19 and CYP2B6 are expressed in different regions of the brain (Miksys & Tyndale, 2002), and secondly, P450 inhibitors metyrapone and ketoconazole increase 5-HT concentrations in the brain (Healy *et al.*, 1999; Murphy, 1997; Kennett *et al.*, 1985; Leret *et al.*, 1998). Moreover, phenytoin, a drug biotransformed by CYP2C9 and CYP2C19 (Giancarlo *et al.*, 2001), increases 5-HT in the brain without enhancing its synthesis (Pratt *et al.*, 1985; Chadwick *et al.*, 1978), suggesting that phenytoin inhibits competitively 5-HT biotransformation.

The biotransformation of 5-HT by P450 yields hydroxylamine, which in presence of catalase and H_2O_2 generates NO^\bullet . In hepatocytes incubated for 72 h, NOS2 was barely detectable, and the amount of NO^\bullet was independent of L-arginine and L-NAME, supporting that the source of NO^\bullet was primarily the P450. Moreover, specific inhibitors of CYP2B6, 2C9 and 2C19 reduced baseline NO^\bullet by around 80%. The source of the 20% remaining NO^\bullet is probably by MAO A pathway. The experiments conducted with

isolated aortic rings evidence that the relaxation elicited by 5-HT depends upon the formation of NO[•]. The relaxation is not due to hydroxylamine because inhibition of catalase prevents the 5-HT-induced relaxation as well as the formation of NO[•]. The fact that methylene blue, an inhibitor of soluble guanylate cyclase (Gruetter *et al.*, 1979), prevents the aortic relaxation triggered by sodium nitroprussiate, a NO[•] donor (Cellek *et al.*, 1996), as well as that elicited by 5-HT in presence of P450 isoforms, further supports that NO[•] is responsible for the vasorelaxation by activating soluble guanylate cyclase (Murad, 1994).

In hepatocytes incubated for 72 h, the maximal efficacy to generate NO[•] from 5-HT, as illustrated by the predicted C_{max}, was 0.55 ± 0.02 μ M. As a reference, in hepatocytes incubated for 24 h where NOS2 was expressed, predicted C_{max} of NO[•] was 0.95 ± 0.04 μ M in presence of increasing doses of L-arginine,. The difference in NO[•] production between the two sources, P450 and NOS2, was reduced when hepatocytes were exposed to P450 enzyme inducers. More than fifteen years ago, the group of Moncada reported that EDRF was NO[•] which was generated from L-arginine by NOS (Palmer *et al.*, 1987). The present study is evidence that NO[•] can also be generated from 5-HT by CYP2C9, CYP2C19 and CYP2B6 in presence of catalase. The actual results confirm the hypothesis raised by Mansuy and Boucher who proposed that cytochrome P450 isoforms might be good candidates to catalyse oxidations similar to those performed by NOS because of the great analogy between these two classes of heme-thiolate proteins (Morgan *et al.*, 2001).

At the present time, there seems to be a fairly clear consensus that at least four distinct receptor types are involved in the endothelium-dependent relaxant effect of 5-

HT. Relaxation to 5-HT is mediated *via* activation of smooth muscle 5-HT₇ receptors (Hoyer *et al.*, 2002) and 5-HT₄ receptors (Prins *et al.*, 1999). In addition, it has been proposed that endothelial 5-HT_{2B} receptors mediate vascular relaxation by the release of NO[•] and increase in cyclic GMP in smooth muscle cells (Glusa & Pertz, 2000). Moreover, 5-HT counteracts smooth muscle contraction by stimulating sodium influx and hyperpolarizing the membrane, effect mediated by 5-HT_{2A} (Rhoden *et al.*, 2000). On the other hand, several reports have shown that 5-HT triggers the relaxation of smooth muscle cells by mechanisms independent of 5-HT receptors, such as the relaxation induced in isolated guinea pig gallbladder strips and in the rat anococcygeus muscle (Emre-Aydingoz *et al.*, 2001; Emre *et al.*, 2000). The present results add another mechanism to explain the receptor-independent smooth muscle relaxation elicited by 5-HT. It is noteworthy that in presence of ketanserin, 5-HT produced a slight relaxation ($P = 0.07$) of precontracted aorta rings, effect completely abolished in denuded aorta rings, suggesting that endothelial cytochrome P450 biotransformed 5-HT. Supporting such hypothesis, CYP2C and 2B are expressed in endothelial cell of arteries (Fisslthaler *et al.*, 2000; Early *et al.*, 2003).

The fact that myoglobin, a NO[•] scavenger (Taira *et al.*, 1997), hinders SNP- but not 5-HT-induced relaxation, and that incubation of 5-HT with recombinant CYP2C9, 2C19 and 2B6 does not generate NO[•], even if 5-HIAA is produced dose-dependently, is further proof that 5-HT biotransformation does not generate NO[•] directly. We speculate that the deamination of 5-HT generates ammonia, which is spontaneously transformed into water and hydroxylamine in presence of hydrogen peroxide. Hydroxylamine is a well-known vasodilator in endothelium-denuded arterial segments via its decomposition

to NO[•] (DeMaster *et al.*, 1989). In agreement with the actual results, the relaxation of smooth muscle induced by hydroxylamine is endothelium-independent, requires catalase to be transformed to NO[•] (Craven *et al.*, 1979), and the relaxation is blocked by methylene blue (Gruetter *et al.*, 1979). Further supporting that 5-HT-induced vasorelaxation is mediated by a catalase-dependent by-product, is the fact that addition of 5-HT, catalase and hydrogen peroxide to the incubation media with recombinant human CYP2C9, 2C19 and 2B6, generated 5-HIAA and NO[•].

The P450 is heavily implicated in the metabolism of arachidonic acid generating EETs, dihydroxyeicosatetraenoic acids (diHETEs) and hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE) derivatives with an important role as paracrine factors and second messengers in the regulation of vascular function. EETs are potent vasodilators, and CYP2C9 contributes to 50% of their production (Roman, 2002). The present report adds to the known role of CYP2C9, 2C19 and 2B6 in the formation of vasoactive substrates. Moreover, since NO[•] modulates the release of neurotransmitters, such as acetylcholine, catecholamines, excitatory and inhibitory aminoacids, 5-hydroxytryptamine, histamine and adenosine (Prast. & Philippu, 2001), the present results raise several questions, primarily which is the role of the cytochrome P450 expression and activity in diseases such as depression and stress (McLeod *et al.*, 2001), aggressive behaviour (Chiavegatto *et al.*, 2001), hyperphagia (Yamada *et al.*, 2000), hypertension (de Wardener, 2001), learning and memory (Yamada *et al.*, 1995), and cephalalgia (D'Andrea, 1999).

ACKNOWLEDGMENTS

Supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP – 43925 and MT-10605). We are grateful to Ms Lucie Héroux, Sanãe Yamaguchi and Linda Beaupré for their excellent technical assistance.

REFERENCES

- BOUCHER, J.L., GENET, A., VADON, S., DELAFORGE, M., HENRY, Y. & MANSUY, D. (1992). Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of N omega-hydroxy-L-arginine by NADPH and O₂ to nitric oxide and citrulline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **187**, 880-886.
- BRUNING, T.A., CHANG, P.C., BLAUW, G.J., VERMEIJ, P. & VAN ZWIETEN PA. (1993) Serotonin-induced vasodilatation in the human forearm is mediated by the "nitric oxide-pathway": no evidence for involvement of the 5-HT₃-receptor. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **22**, 44-51.
- CAPDEVILA, J., CHOCOS, N., WERRINGLOER, J., PROUGH, R.A. & ESTABROOK, R.W. (1981). Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 5362-5366.
- CELLEK, S., KASAKOV, L. & MONCADA S. (1996). Inhibition of nitregeric relaxations by a selective inhibitor of the soluble guanylate cyclase. *Br. J. Pharmacol.*, **118**, 137-140.
- CHIAVEGATTO, S., DAWSON, V.L., MAMOUNAS, L.A., KOLIATSOS, V.E., DAWSON, T.M. & NELSON, R.J. (2001). Brain serotonin dysfunction accounts for aggression in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 1277-1281.
- CRAVEN, P.A., DERUBERTIS, R.F. & PRATT, W.D. (1979). Electron spin resonance study of the role of NO[•] catalase in the activation of guanylate cyclase by NaN₃ and NH₂OH. Modulation of enzyme responses by heme proteins and their nitrosyl derivatives. *J. Biol. Chem.*, **254**, 8213-8222.
- D'ANDREA, G. (1999). Nitric oxide pathway, Ca²⁺ and serotonin. *Cephalalgia*, **19**, 767.
- DE WARDENER, H.E. (2001). The hypothalamus and hypertension. *Physiol. Rev.*, **81**, 1599-1658.
- DEMASTER, E.G., RAIJ, L., ARCHER, S.L. & WEIR, E.K. (1989). Hydroxylamine is a vasorelaxant and a possible intermediate in the oxidative conversion of L-arginine to nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163**, 527-533.

- EARLEY, S., PASTUSZYN, A. & WALKER, B.R. (2003). Cytochrome p-450 epoxygenase products contribute to attenuated vasoconstriction after chronic hypoxia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, H127-136.
- EL-KADI, A.O.S., MAURICE, H., ONG, H. & DU SOUICH, P. (1997). Down regulation of the hepatic cytochrome P450 by an acute inflammatory reaction: implication of human and animal serum, and intrahepatic mediators. *Br. J. Pharmacol.*, **121**, 1164-1170.
- EMRE, S., ERDEM, S.R. & TUNCER, M. (2000). Does serotonin relax the rat anococcygeus muscle via 5-HT₇ receptors? *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **362**, 96-100.
- EMRE-AYDINGOZ, S., ERDEM, S.R. & TUNCER, M. (2001). Relaxation induced by serotonin and sumatriptan in isolated guinea pig gallbladder strips. *Res. Exp. Med.*, **200**, 175-182.
- FISLTHALER, B., HINSCH, N., CHATAIGNEAU, T., POPP, R., KISS, L., BUSSE, R. & FLEMING, I. (2000) Nifedipine increases cytochrome P450_{2C} expression and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in coronary arteries. *Hypertension*, **36**, 270-275.
- FISLTHALER, B., POPP, R., KISS, L., POTENTE, M., HARDER, D.R., FLEMING, I. & BUSSE, R. (1999). Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*, **401**, 493-497.
- FOLK, J.E. & CHUNG, S.I. (1985). Transglutaminases. *Methods Enzymol.*, **113**, 358-75.
- FRADETTE, C., BLEAU, A.M., PICHETTE, V., CHAURET, N. & DU SOUICH, P. (2002). Hypoxia-induced down-regulation of CYP1A1/1A2 and up-regulation of CYP3A6 involves serum mediators. *Br. J. Pharmacol.*, **137**, 881-891.
- GIANCARLO, G.M., VENKATAKRISHNAN, K., GRANDA, B.W., VON MOLTKE, L.L. & GREENBLATT, D.J. (2001). Relative contributions of CYP2C9 and 2C19 to phenytoin 4-hydroxylation in vitro: inhibition by sulfaphenazole, omeprazole, and ticlopidine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **57**, 31-36.
- GLUSA, E. & PERTZ, H.H. (2000). Further evidence that 5-HT-induced relaxation of pig pulmonary artery is mediated by endothelial 5-HT_{2B} receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 692-698.

- GRISHAM, M.B., JOHNSON, G.G. & LANCASTER J.R. JR. (1996). Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol.*, **268**, 237-246.
- GRUTTER, C.A., BARRY, B.K., MCNAMARA, D.B., GRUETTER, D.Y., KADOWITZ, P.J. & IGNARRO, L.J. (1979). Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. *J. Cyclic Nucleotide Res.*, **5**, 211-224.
- HEALY, D.G., HARKIN, A., CRYAN, J.F., KELLY, J.P. & LEONARD, B.E. (1999). Metyrapone displays antidepressant-like properties in preclinical paradigms. *Psychopharmacology* (Berl), **145**, 303-308.
- HILDEBRANDT, A.G. (1972). The binding of metyrapone to cytochrome P-450 and its inhibitory action on microsomal hepatic mixed function oxidation reactions. *Biochem. Soc. Symp.*, **34**, 79-102.
- HOYER, D., HANNON, J.P., MARTIN & G.R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **71**, 533-554.
- KENNETT, G.A., DICKINSON, S.L. & CURZON, G. (1985). Central serotonergic responses and behavioural adaptation to repeated immobilisation: the effect of the corticosterone synthesis inhibitor metyrapone. *Eur. J. Pharmacol.*, **119**, 143-152.
- LERET, M.L., ANTONIO, M.T. & ARAHUETES, R.M. (1998). Effect of metyrapone administration in pregnant rats on monoamine concentration in fetal brain. *Life Sci.*, **62**, 1943-1948.
- LOMAESTRO, B.M. & PIATEK, M.A. (1998). Update on drug interactions with azole antifungal agents. *Ann. Pharmacother.*, **32**, 915-928.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- MCLEOD, T.M., LOPEZ-FIGUEROA, A.L. & LOPEZ-FIGUEROA, M.O. (2001). Nitric oxide, stress, and depression. *Psychopharmacol. Bull.*, **35**, 24-41.
- MIAN, K.B. & MARTIN, W. (1995). The inhibitory effect of 3-amino-1,2,4-triazole on relaxation induced by hydroxylamine and sodium azide but not hydrogen peroxide or glyceryl trinitrate in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.*, **116**, 3302-3308.

- MIKSYS, S.L. & TYNDALE, R.F. (2002). Drug-metabolizing cytochrome P450s in the brain. *J. Psychiatry. Neurosci.*, **27**, 406-415.
- MORGAN, E.T., ULLRICH, V., DAIBER, A., SCHMIDT, P., TAKAYA, N., SHOUN, H., MCGIFF, J.C., OYEKAN, A., HANKLE, C.J., CAMBELL, W.B., PARK, C.S., KANG, J.S., YI, H.G., CHA, Y.N., MANSUY, D. & BOUCHER, J.L. (2001). Cytochromes P450 flavin monooxygenases-targets and sources of nitric oxide. *Drug Met. Disp.*, **29**, 1366-1376.
- MURAD, F. (1994). Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide : the NO-cyclic GMP signal transduction system. *Advances in Pharmacology*, **26**, 19-33.
- MURPHY, B.E. (1997). Antigluocorticoid therapies in major depression: a review. *Psychoneuroendocrinology*, **22**, (Suppl 1) S125-132.
- MYLECHARANE, E.J. (1990). Mechanisms involved in serotonin-induced vasodilatation. *Blood Vessels*, **27**, 116-126.
- PALMER, R.M., FERRIGE, A.G. & MONCADA, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**, 524-526.
- PRAST, H. & PHILIPPU, A. (2001). Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog. Neurobiol.*, **64**, 51-68.
- PRATT, J.A., JENNER, P. & MARSDEN, C.D. (1985). Comparison of the effects of benzodiazepines and other anticonvulsant drugs on synthesis and utilization of 5-HT in mouse brain. *Neuropharmacology*, **24**, 59-68.
- PRINS, N.H., VAN HASELEN, J.F., LEFEBVRE, R.A., BRIEJER, M.R., AKKERMANS, L.M. & SCHUURKES, J.A. (1999). Pharmacological characterization of 5-HT₄ receptors mediating relaxation of canine isolated rectum circular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **127**, 1431-1437.
- PROJEAN, D., BAUNE, B., FARINOTTI, R., FLINOIS, J.P., BEAUNE, P., TABURET, A.M. & DUCHARME, J. (2003). In vitro metabolism of chloroquine identification of CYP2C8, CYP3A4 and CYP2D6 as the main isoforms catalyzing N-desethylchloroquine formation. *Drug Metab. Dispos.*, **31**, 748-754.

- RHODEN, K.J., DODSON, A.M. & KY, B. (2000). Stimulation of the Na(+)-K(+) pump in cultured guinea pig airway smooth muscle cells by serotonin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **293**, 107-112.
- ROMAN, R.J. (2002). P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol. Rev.*, **82**, 131-185.
- SAXENA, P.R., DE VRIES, P. & VILLALÓN, C.M. (1998). 5-HT₁-like receptors: a time to bid goodbye. *Trends Pharmacol. Sci.*, **19**, 311 – 316.
- SEGLEN, P.O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell. Biol.*, **13**, 29-83.
- TAIRA, J., MISIK, V. & RIESZ, P. (1997). Nitric oxide formation from hydroxylamine by myoglobin and hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Acta*, **1336**, 502-508.
- THOLLON, C., FOURNET-BOURGUIGNON, M.P., SABOUREAU, D., LESAGE, L., REURE, H., VANHOUTTE, P.M & VILAINE, J.P. (2002). Consequences of reduced production of NO on vascular reactivity of porcine coronary arteries after angioplasty: importance of EDHF. *Br. J. Pharmacol.*, **136**, 1153-1161.
- TSURU, H., NAKAI, S., UCHIYAMA, T. & TERANISHI, Y. (1998). Endothelium-independent relaxant effect of 5- hydroxytryptamine (5-HT) on the isolated rabbit facial vein. *J. Smooth Muscle Res.*, **34**, 101-110.
- VAN AMSTERDAM, J.G. & OPPERHUIZEN, A. (1999). Nitric oxide and biopterin in depression and stress. *Psychiatry Res.*, **85**, 33-38.
- YAMADA, J., SUGIMOTO, Y. & KUNITOMO, M. (2000). A nitric oxide synthase inhibitor reduces hyperphagia induced in rats by the 5-HT(1A) receptor agonist, 8-OH-DPAT, independently of hypothalamic serotonin metabolism. *Eur. J. Pharmacol.*, **402**, 247-250.
- YAMADA, K., NODA, Y., NAKAYAMA, S., KOMORI, Y., SUGIHARA, H., HASEGAWA, T. & NABESHIMA, T. (1995). Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. *Br. J. Pharmacol.*, **115**, 852-858.

YAMAGUCHI, N. (1993). In vivo evidence for adrenal catecholamine release mediated by nonnicotinic mechanism: local medullary effect of VIP. *Am. J. Physiol. Regulatory. Integrative Comp. Physiol.*, **265**, R766-R771.

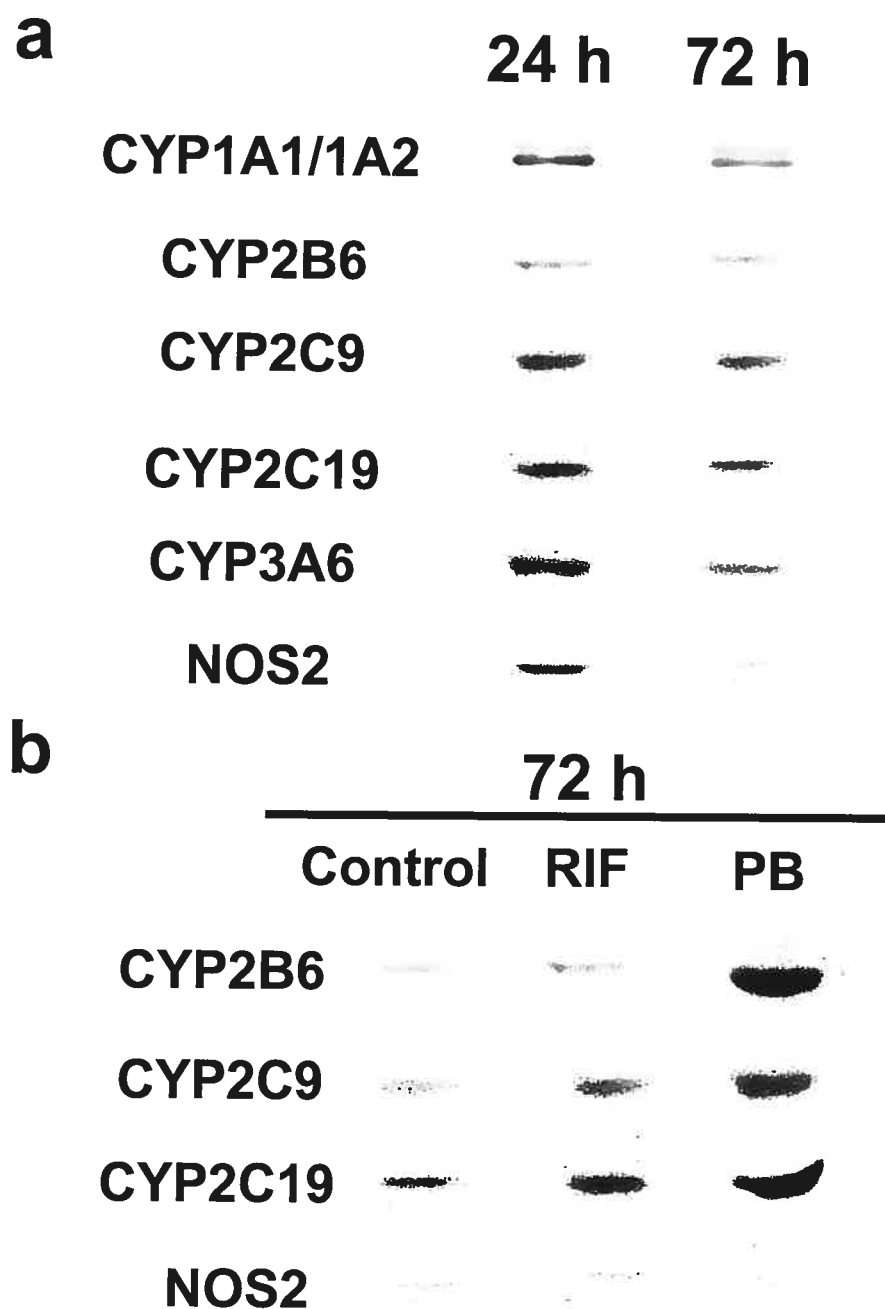


Figure 8.1 a. Immunoblot analysis of CYP1A1/1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A6 and NOS2 in rabbit's hepatocytes incubated for 24 and 72 h. **b.** Immunoblot analysis of CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 and NOS2 in rabbit's hepatocytes following 72 h incubation with rifampicin (RIF, 10 μ M) and phenobarbital (PB, 125 μ M).

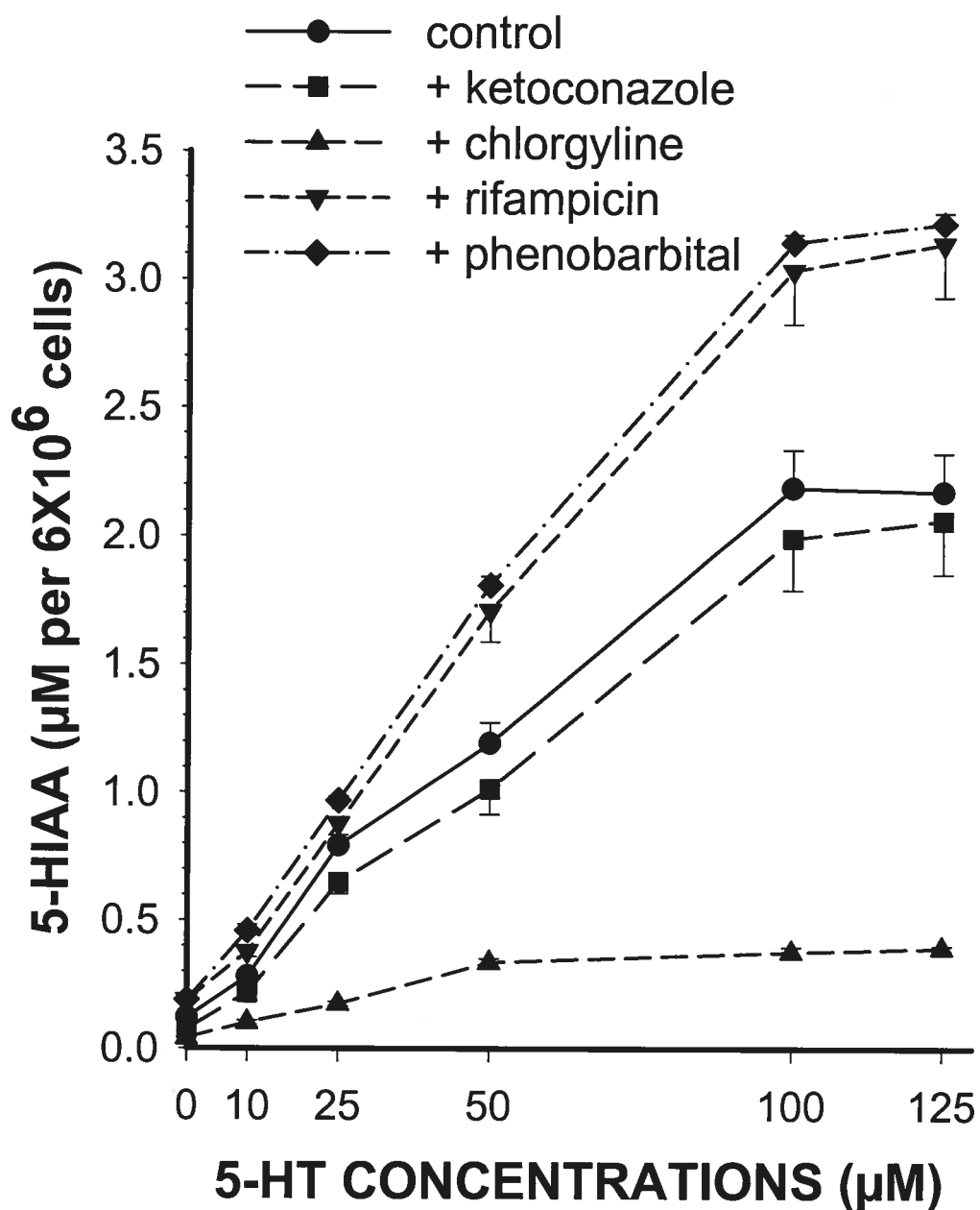


Figure 8.2 5-Hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) concentrations following 4 h of incubation of increasing concentrations of 5-hydroxytryptamine (5-HT) with control hepatocytes and hepatocytes exposed for 72 h to ketoconazole (50 μM), chlorgyline (25 μM), rifampicin (10 μM), and phenobarbital (125 μM). Each point is mean ± s.e. of $n = 8$.

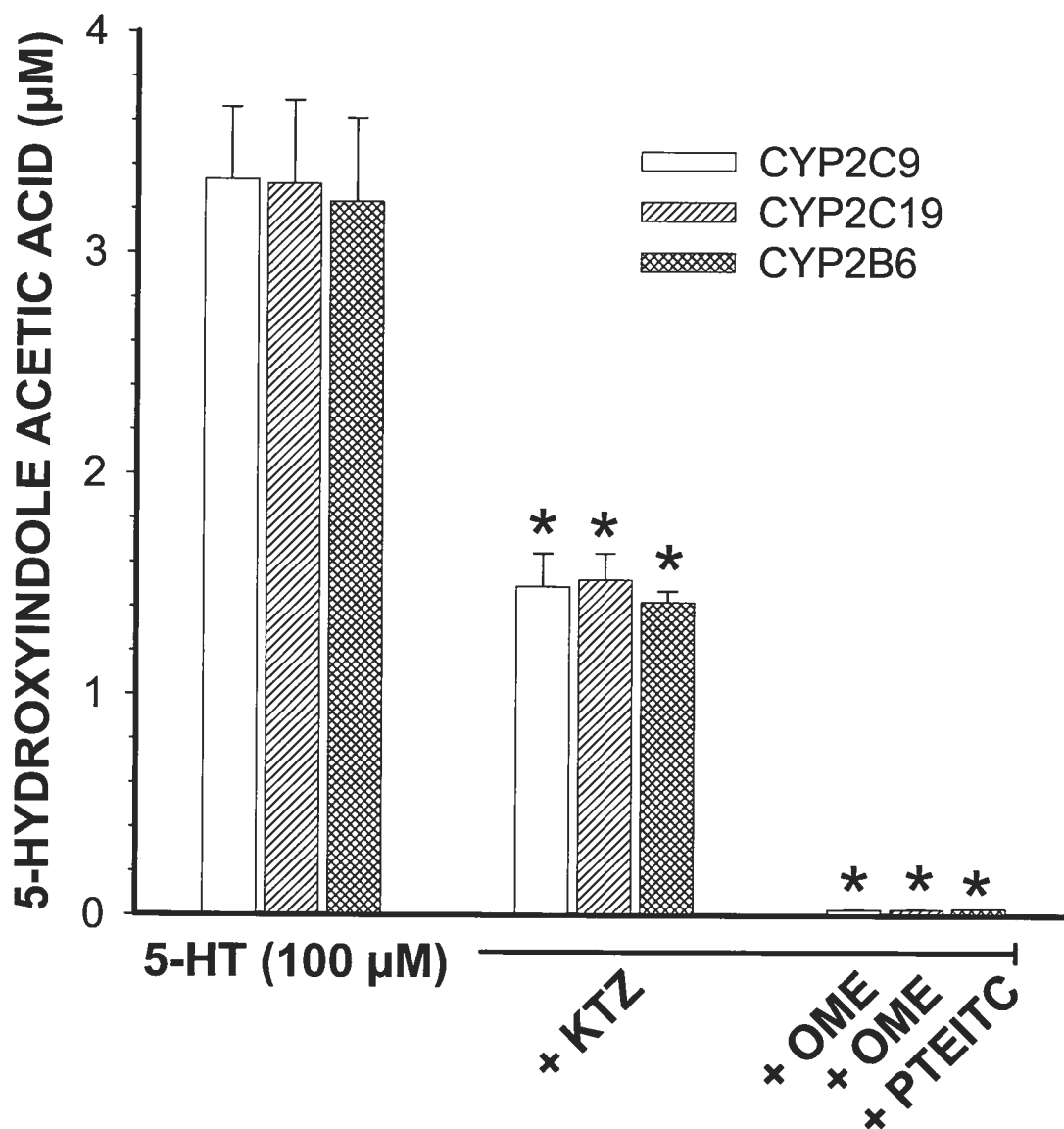


Figure 8.3 Formation of 5-hydroxyindole acetic acid by human recombinant CYP2B6, CYP2C9 and CYP2C19 after incubation with 5-hydroxytryptamine (5-HT, 100 μM) alone or in presence of ketoconazole (KTZ, 50 μM), omeprazole (OME, 50 μM), and β-phenylethyl isothiocyanate (PEITC, 50 μM). Each point is mean ± s.e. of $n = 8$.

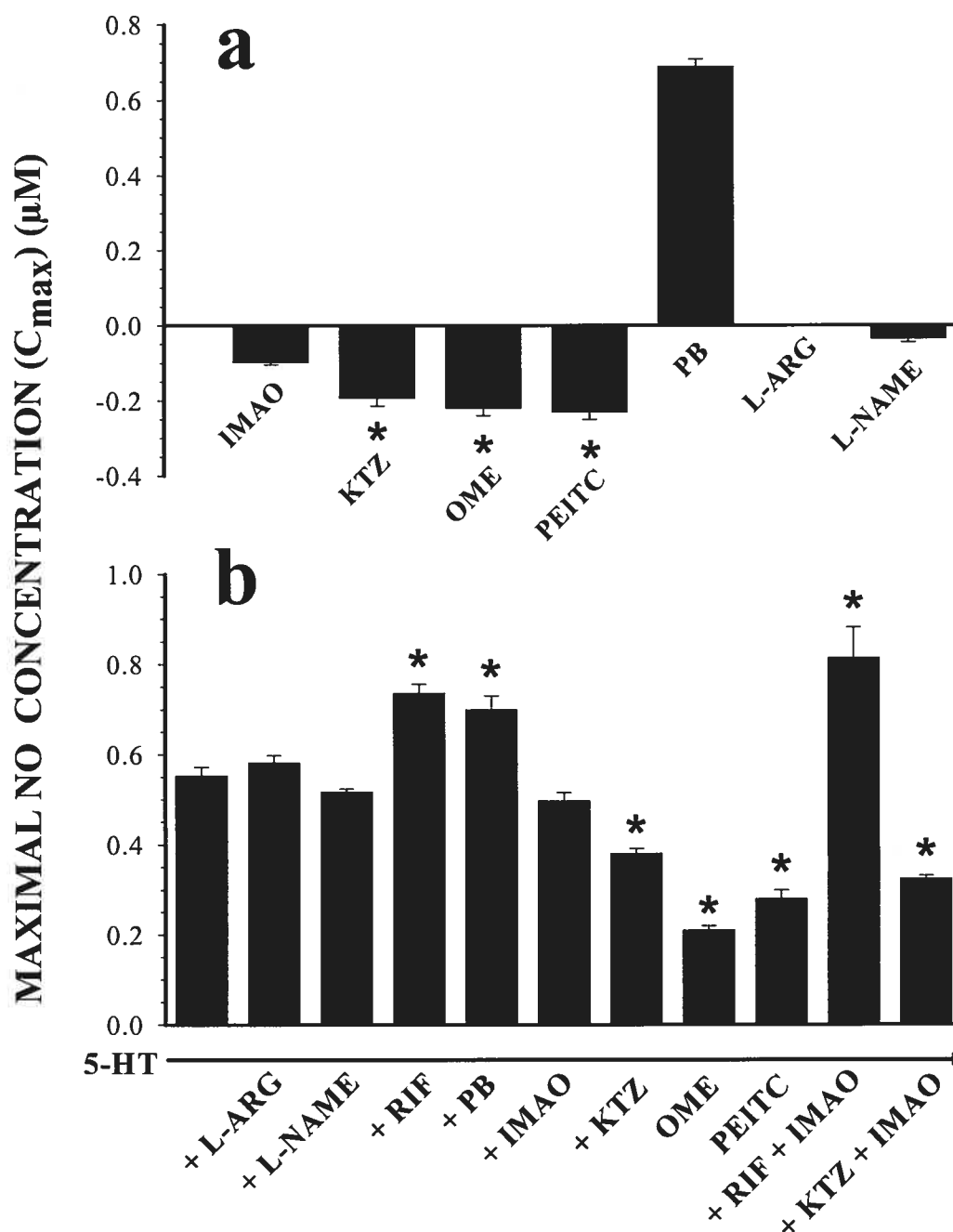


Figure 8.4 **a.** Predicted maximal concentrations of baseline NO^* (C_{\max}) in hepatocytes incubated for 72 h with chlorgyline (IMAO, 10-50 μM), ketoconazole (KTZ, 10-50 μM), omeprazole (OME, 10-50 μM), β -phenylethylisothiocyanate (PEITC, 10-50 μM), phenobarbital (PB, 50-200 μM), L-arginine (L-ARG, 0.1-1 mM) and N,G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 0.1-1 mM) added to the incubation media at 68 h. **b.** Predicted NO^* C_{\max} in hepatocytes incubated for 72 h with L-ARG (0.5 mM), L-NAME (0.5 mM), rifampicin (RIF, 10 μM), phenobarbital (PB, 125 μM), IMAO (25 μM), KTZ (25 μM), OME (50 μM) and PEITC (50 μM) in presence of 5-hydroxytryptamine (5-HT, 10-125 μM) added at 68 h. Vertical bars are mean \pm s.e. of $n = 4$.

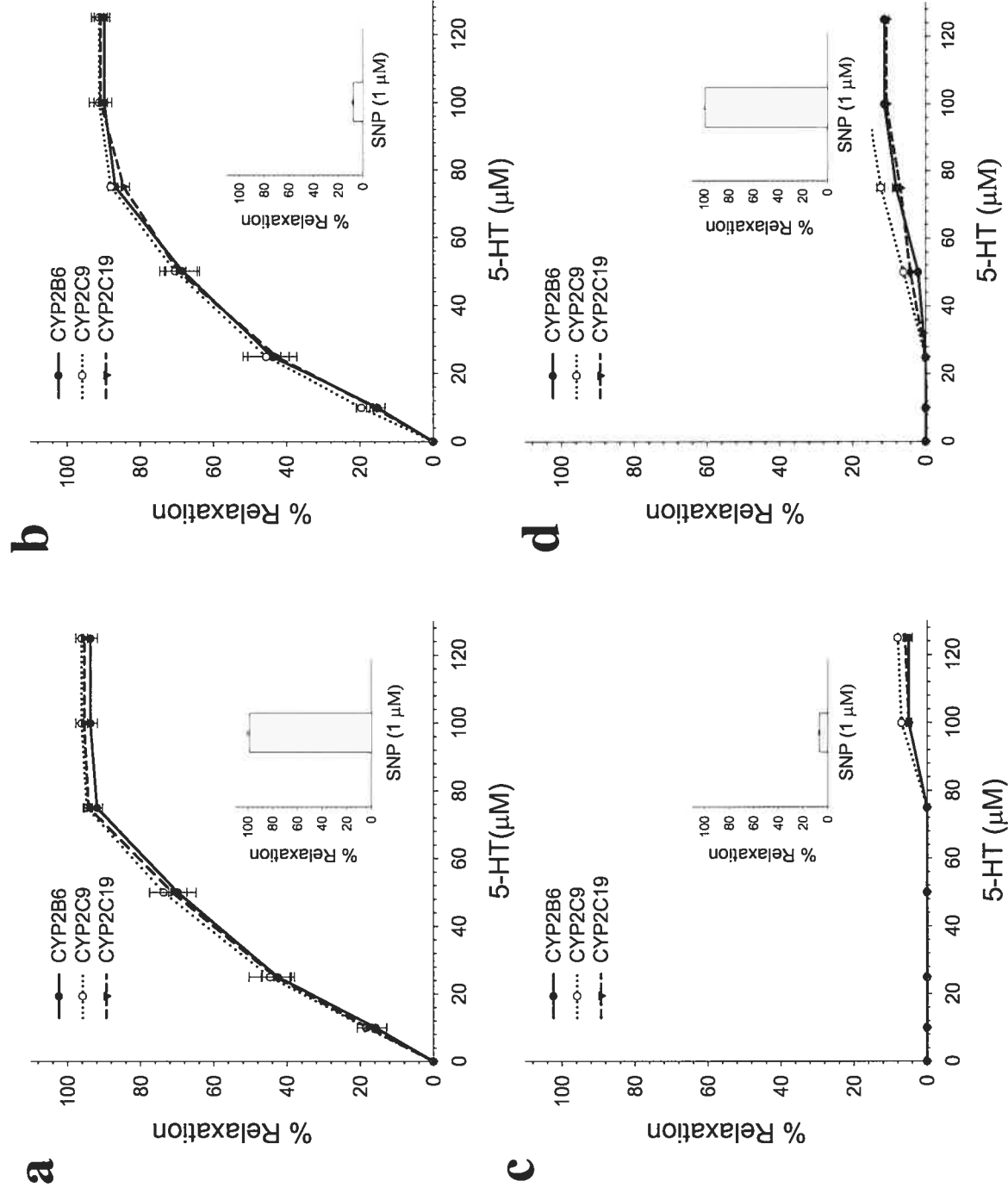


Figure 8.5 a. Concentration-response curves of the relaxation induced by 5-hydroxytryptamine (5-HT) in presence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2C19 in endothelium-denuded aortic rings precontracted with phenylephrine (PE, 100 nM). The inside histogram represent the relaxation elicited by sodium nitroprussiate. **b.** Effect of myoglobin (50 μM) on concentration-response curves of 5-HT- and SNP-induced relaxation in presence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2C19 in endothelium-denuded rings precontracted with PE (5 mM). **c.** Effect of methylene blue (30 μM) on concentration-response curves of 5-HT- and SNP-induced relaxation in presence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2C19 in endothelium-denuded rings precontracted with PE (5 mM). **d.** Effect of the catalase inhibitor, 3-amino-1,2,4-triazole (50 mM), on concentration-response curves of 5-HT- and SNP-induced relaxation in presence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2C19 in endothelium-denuded rings precontracted with PE (5 mM). Each point is mean \pm s.e. of $n = 6$.

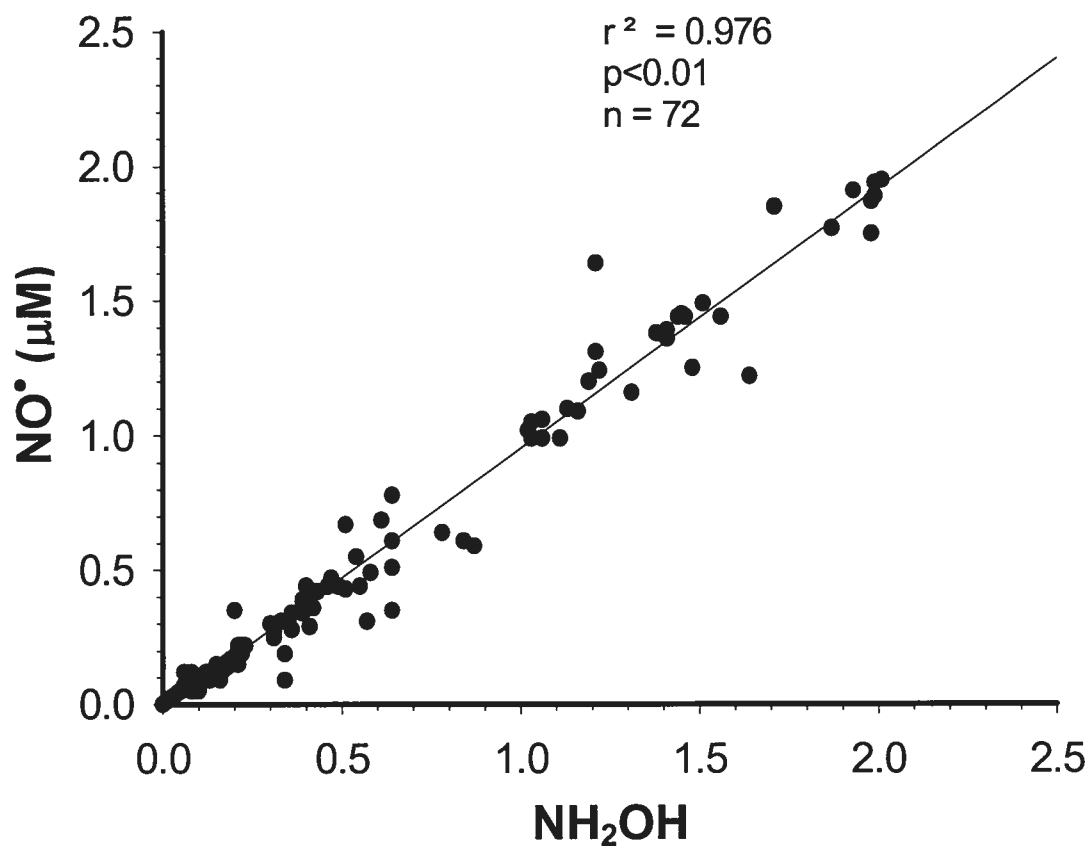


Figure 8.6 Concentration of NO^\bullet generated by the biotransformation of serotonin by CYP2B6, CYP2C9 and CYP2C19 in presence of catalase, as a function of hydroxylamine concentration produced by CYP2B6, CYP2C9 and CYP2C19 in absence of catalase.

TROISIÈME PARTIE

DISCUSSION ET CONCLUSION

DISCUSSION

La clairance de la théophylline peut être réduite chez les patients présentant une maladie pulmonaire obstructive chronique, un oedème pulmonaire aigu ou une insuffisance cardiaque congestive (Piafsky et coll. 1977; Kuntz et coll., 1983; du Souich et coll., 1989). Afin d'améliorer l'utilisation des médicaments et d'éviter des effets indésirables, il importe de connaître les mécanismes sous-jacents à la diminution de la clairance des médicaments par l'hypoxie. Cette réduction de la clairance des médicaments a été associée à une diminution de la quantité et de l'activité du cytochrome P450. Il est essentiel de comprendre pourquoi l'organisme répond à certaines maladies par des changements d'expression des enzymes du cytochrome P450.

Les résultats des premières études *in vivo* et *in vitro*, réalisées dans le but de déterminer l'effet de la maladie respiratoire sur la biotransformation des médicaments, ont été assez contradictoires, même s'il a été conclu que l'hypoxie réduit l'activité de multiples mécanismes de biotransformation (Jones, 1981). Une explication à ces résultats contradictoires émanait des protocoles expérimentaux, de l'espèce animale, du temps d'exposition à l'hypoxie, et la présence ou non d'hypobarie. Plus récemment, il a été démontré *in vivo* que la réduction de la clairance de certains médicaments par l'hypoxie est associée à une diminution de la clairance métabolique, secondairement à la diminution de la quantité et de l'activité du cytochrome P450 (du Souich et coll. 1984; 1989). Spécifiquement, des études avec des lapins ont montré que l'hypoxémie aiguë diminue la clairance de médicaments dont la biotransformation est réalisée par les

cytochromes CYP1A1 et 1A2. De plus, l'hypoxémie augmente l'expression du CYP3A6 (Kurdi et coll., 1999), ainsi que la peroxidation des lipides (Barakat et du Souich, 1996, Galal et du Souich, 1999). Les effets provoqués par l'hypoxie peuvent toutefois être prévenus par le traitement des animaux avec des aminostéroïdes (Galal et du Souich, 1999).

In vivo, l'effet de l'hypoxie sur le cytochrome P450 ressemble à celui d'une réaction inflammatoire locale. En effet, tous deux entraînent une diminution de l'activité et de l'expression de plusieurs cytochromes P450, à l'exception de la régulation négative du CYP3A par l'inflammation. La réaction inflammatoire induite par l'injection sous-cutanée de la térébenthine entraîne la libération de médiateurs sériques, tels l'IL-6 et l'IL-1 β responsables de la diminution des cytochromes P450 (Bleau et coll., 2003). En ce qui concerne l'hypoxie, cette pathologie induit aussi la libération de plusieurs cytokines, tels que l'IL-1 β , l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IFN- γ , le TNF- α (Naldini et coll., 1997; Benyo et coll., 1997; Krishnaswamy et coll., 1999) ainsi qu'une cytokine hématopoïétique, l'érythropoïétine (Epo) (Lacombe et Mayeux, 1999). Par similitude à l'inflammation, ces observations permettent d'émettre l'hypothèse que ces cytokines pourraient être responsables de la modulation du cytochrome P450 par l'hypoxie. Cette hypothèse est en partie supportée par les résultats de Calleja et coll. (1997; 1998) qui avaient démontré que ces cytokines pouvaient induire des changements d'expression des gènes du cytochrome P450. De plus, il a été démontré *in vitro* que l'addition de cytokines à des hépatocytes en culture reproduit les phénomènes observés *in vivo*, c'est-à-dire produit une diminution de l'activité et de l'expression des cytochromes P450 (Calleja et coll., 1997).

En présence d'hypoxie, l'activation de facteurs de transcription, comme le HIF-1, sont responsables de la modification de l'expression de nombreux gènes ce qui a pour conséquence d'augmenter la perfusion tissulaire et le métabolisme cellulaire (Semenza et coll., 1997; Piacentini et Karliner, 1999). Ainsi, nous avons spéculé que des cytokines et le HIF-1 pourraient être impliqués dans les changements des cytochromes P450 hépatique produits par l'hypoxie.

Les objectifs du projet de recherche étaient de déterminer si l'hypoxie induit la libération de médiateurs sériques responsables des changements d'expression et d'activité du cytochrome P450, d'identifier ces médiateurs puis finalement, de déterminer la ou les voies de signalisation impliquées.

L'utilisation de sérums provenant de lapins soumis à 48 hrs d'hypoxie nous a permis de confirmer la présence de médiateurs dans le sang capables de moduler le cytochrome P450 dans le foie. Par la suite, le fractionnement du sérum provenant d'animaux avec hypoxie a tout d'abord permis d'obtenir un indice quant à la nature des médiateurs impliqués; ce fractionnement, a aussi permis de confirmer deux phénomènes bien distincts induits par l'hypoxie sur le cytochrome P450, c'est-à-dire la réduction et l'induction de certaines isoformes. En effet, suite à l'exposition des hépatocytes aux sérums pendant 24 hrs, nous avons observé une diminution de la quantité de protéines des CYP1A1 et 1A2 et une augmentation de l'expression du CYP3A6. Finalement, l'immuno-neutralisation des médiateurs a permis de cibler directement les cytokines sécrétées dans le sérum qui exercent un effet sur les cytochromes P450. Ainsi, nous

avons identifié les médiateurs responsables des changements de l'activité et de l'expression des CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6 et du contenu total en cytochrome P450.

Dans les sections qui vont suivre, nous allons discuter, en tenant compte des résultats de notre projet de recherche, des facteurs qui régulent l'activité et l'expression des CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6. Par la suite, nous discuterons de l'effet de d'autres pathologies sur le cytochrome P450 et comparerons ces effets avec ceux induits par l'hypoxie. Puis finalement, nous discuterons du rôle physiologique des enzymes du cytochrome P450.

I- Régulation des cytochromes P450

Dans notre modèle d'hypoxie, les médiateurs sériques responsables des changements d'activité et d'expression du cytochrome P450 sont des cytokines. Les mécanismes par lesquels les cytokines causent la modulation du cytochrome P450 dans les hépatocytes font présentement l'objet d'intenses recherches (Morgan, 1997; Bleau et coll., 2002). De façon générale, la liaison d'une cytokine à son récepteur spécifique entraîne l'activation de plusieurs protéines impliquées dans les voies de transduction du signal, dont certains facteurs de transcription susceptibles de modifier directement l'expression de gènes spécifiques. L'activation et/ou l'inhibition de la phosphorylation de protéines, induites par les cytokines, représente un autre mécanisme. Plus spécifiquement, la liaison d'une cytokine à son récepteur entraîne la dimérisation de ce dernier et induit le recrutement de molécules adaptrices telles que les protéines associées Janus tyrosine kinase (JAKs), TRAF (TNF receptor-associated factor), TRADD (TNF-receptor-associated DD protein) ou encore FADD (Fas-associating protein with a DD). Ces molécules adaptrices activent ensuite une multitude de kinases telles les PTK, les PKC et les MAPKs (Auron, 1998; Baud et Karin, 2001) qui à leur tour activent de multiples facteurs de transcription. De plus, par le biais des molécules adaptrices TRADD et FADD, les cytokines activent la sphingomyélinase (SMase) qui augmente la production de céramide et par le fait même, la production de SOR dans les mitochondries (Mathias et coll., 1998; Augé et coll., 2000). Chacune de ces kinases et/ou SOR a donc la capacité d'induire une voie de signalisation pouvant mener à la modulation de l'activité et/ou de l'expression du cytochrome P450.

A- Facteurs qui régulent l'activité des CYP1A1 ET 1A2

Les changements d'activité du cytochrome P450 surviennent généralement à l'intérieur d'un court laps de temps et constituent le premier changement observé durant l'hypoxie. En effet, après 4 hrs d'incubation avec du sérum provenant d'animaux avec hypoxie, nous observons déjà une baisse d'activité, caractérisée par la diminution du métabolisme de la théophylline, sans changement du contenu total en cytochrome P450 et de la quantité en protéines dans des hépatocytes en culture (Fradette et coll., 2002). Dans notre modèle d'hypoxie, l'IFN- γ , l'IL-1 β et l'IL-2 sont responsables de la diminution de l'activité des CYP1A1 et 1A2 *in vitro*. En bloquant l'activité des cytokines individuellement par immuno-neutralisation, nous récupérons entre 80 à 90% de l'activité initiale du cytochrome P450. Ces résultats suggèrent l'effet additif de plusieurs cytokines et peut-être aussi, l'existence de chevauchement entre les voies de signalisation induites par ces cytokines.

La diminution de l'activité de cytochrome P450 provoquée par le sérum est observée seulement dans des hépatocytes provenant de lapins avec hypoxémie, suggérant que les hépatocytes doivent être sensibilisés afin de réagir avec le sérum. Cette sensibilisation entraînerait probablement l'augmentation de la densité des récepteurs aux cytokines à la surface des cellules. Effectivement, l'hypoxie provoque l'augmentation de l'expression des récepteurs aux cytokines (Simms et D'Amico, 1996; Takabatake et coll., 2000). La réduction de l'activité persiste au moins après 24 hr d'incubation avec le sérum. Après cette période d'incubation, il se produit également une régulation négative des isoformes CYP1A1 et CYP1A2 (Fradette et coll., 2002).

Plusieurs mécanismes pourraient moduler l'activité des cytochromes CYP1A1 et CYP1A2. Parmi ces mécanismes, l'activation et/ou l'inhibition de protéine kinases, de même que la production de SOR sont les plus probables.

Plusieurs études laissent entrevoir que des protéine kinases participent à la réduction de l'activité du cytochrome P450. Effectivement, des données *in vitro* montrent que l'effet des cytokines sur le cytochrome P450, aux niveaux génique et protéique se réalise par le biais de l'activation de protéine kinases (Kikuchi et coll., 1998; Honkakoski et Negishi, 1998; Moritz et coll., 1998). La phosphorylation directe des protéines constitue un mécanisme plausible pour expliquer la diminution d'activité du cytochrome P450 par les kinases (Oesch-Bartlomowicz et Oesch, 1990). *In vitro*, les CYP2B1, CYP2B2 et CYP2C2 peuvent être phosphorylés sur des résidus sérine et thréonine par la PKA et la PKC entraînant une perte de leur activité catalytique (Eliasson et coll., 1994; Moritz et coll., 1998). Toutefois, les différents cytochromes P450 ne démontrent pas la même sensibilité à la phosphorylation. En effet, il a été démontré que les CYP1A1 et CYP1A2 ne seraient pas phosphorylés par la PKA ni la PKC, alors que cette phosphorylation est fréquemment observée chez les isoformes de la sous-famille CYP2B (Oesch-Bartlomowicz et coll., 1997). De plus, il est maintenant accepté que les phosphatases ont aussi un rôle dans la régulation de l'activité du cytochrome P450 (Carballo et coll., 1999).

Tel que mentionné précédemment, les cytokines contenues dans le sérum provenant de lapins avec hypoxie participent à la formation de SOR. En effet, l'IFN- γ , l'IL-1 β et l'IL-2 ont tous la capacité d'induire la production de SOR tels le $\bullet\text{O}_2^-$, le H_2O_2

et le OH^\bullet (Ghezzi et coll., 1991), de même que la formation de NO^\bullet dans les hépatocytes (Spitzer, 1994). Les SOR peuvent être un maillon dans les voies de signalisation activées par les cytokines. Les SOR peuvent entre autres augmenter l'activité des protéine kinases impliquées dans les voies de signalisation des cytokines (Robinson et coll., 1999; Jun et coll., 1999; Finkel, 2000). Ainsi, tel que mentionné précédemment, l'activation de protéine kinases par les cytokines et/ou les SOR peut par la suite, moduler l'activité du cytochrome P450.

Les SOR peuvent aussi diminuer directement l'activité de divers cytochromes P450 (Karuzina et Archakov, 1994). *In vivo*, l'hypoxie induit la peroxydation des lipides hépatiques, l'activité de la superoxide dismutase, de même que la concentration de substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) dans le foie, tout en diminuant le glutathion réduit hépatique, l'activité de la glutathion peroxydase et bien entendu l'activité des CYP1A1 et CYP1A2 (Proulx et du Souich, 1995; Galal et du Souich, 1999). Ces changements induits par l'hypoxie, pourraient être causés par la formation de SOR (Minor et coll., 1993; Gess et coll., 1997). Appuyant cette hypothèse, notre laboratoire a démontré que l'incubation d'hépatocytes avec le H_2O_2 et le nitroprussiate de sodium (donneur de NO^\bullet) pendant 4 hrs diminue l'activité des CYP1A1 et 1A2 (El-Kadi et coll., 2000). Supportant le rôle des SOR dans la diminution de l'activité du cytochrome P450 par l'hypoxie, le pré-traitement avec le 21-aminostéroïde U74389G prévient la diminution de l'activité des CYP1A1 et CYP1A2, de même que l'augmentation de TBARS (Galal et du Souich, 1999). Les 21-aminostéroïdes sont des substances avec des propriétés antioxydantes plutôt complexes secondaires à leur capacité à piéger les SOR (Braugher et coll., 1987; Braugher et

Pregenzer, 1989; Althaus et coll., 1993). Les 21-aminostéroïdes peuvent neutraliser le $\cdot\text{O}_2^-$ (Fabian et coll., 1998), le H_2O_2 (Horwitz et coll., 1996), le $\text{OH}\cdot$ (Khalil et coll., 1998), le $\text{NO}\cdot$ (Fernandez Rodriguez et coll., 1997) ainsi que le ONOO^- (Fici et coll., 1997).

Par sa propriété de radical libre, le $\text{NO}\cdot$ peut se lier à des hémoprotéines en formant un complexe nitrosyl stable avec l'ion ferreux. Ainsi, le $\text{NO}\cdot$ a la capacité d'inhiber réversiblement ou irréversiblement l'activité catalytique du cytochrome P450 (Wink et coll., 1993). Le $\text{NO}\cdot$ peut produire une diminution partiellement irréversible de l'activité des cytochromes P450 en réagissant avec des résidus d'acides aminés critiques pour l'activité, comme la nitration de résidus tyrosine (Roberts et coll., 1998). Alternativement, le $\text{NO}\cdot$ est capable de réagir avec des SOR, particulièrement le $\cdot\text{O}_2^-$, afin de produire du peroxynitrite (ONOO^-), un oxidant très puissant. Le peroxynitrite peut modifier l'activité de protéines par le biais d'oxydation, telle que la nitrosylation, suivie de la formation d'un disulfide, transformant ainsi les enzymes en protéines irréversiblement inactives (van der Loo et coll., 2000). La nitration de résidus tyrosine, entre autres du CYP2B1, par le peroxynitrite entraîne son inhibition irréversible (Roberts et coll., 1998). Le rôle du $\text{NO}\cdot$ dans l'inhibition du cytochrome P450 est aussi mis en évidence par le fait que l'inhibition de la NOS atténue la baisse de l'activité des cytochromes P450 produite par le LPS ou par la réaction inflammatoire secondaire à la térébenthine (Carlson et Billings, 1996; Khatsenko et Kikkawa, 1997; El-Kadi et coll., 2000).

Les SOR peuvent donc affecter l'activité des cytochromes P450 de deux manières : 1) les SOR peuvent être impliquées dans l'activation de protéine kinases menant à la phosphorylation de divers cytochromes P450 et ainsi diminuer leur activité catalytique ou encore 2) les SOR tels le $\cdot\text{O}_2^-$, le H_2O_2 , le OH^\bullet et le NO^\bullet peuvent se lier directement aux cytochromes P450 et réduire leur activité de manière réversible et irréversible de par leur propriété de radical libre (Halliwell et coll., 1995; McCord, 2000).

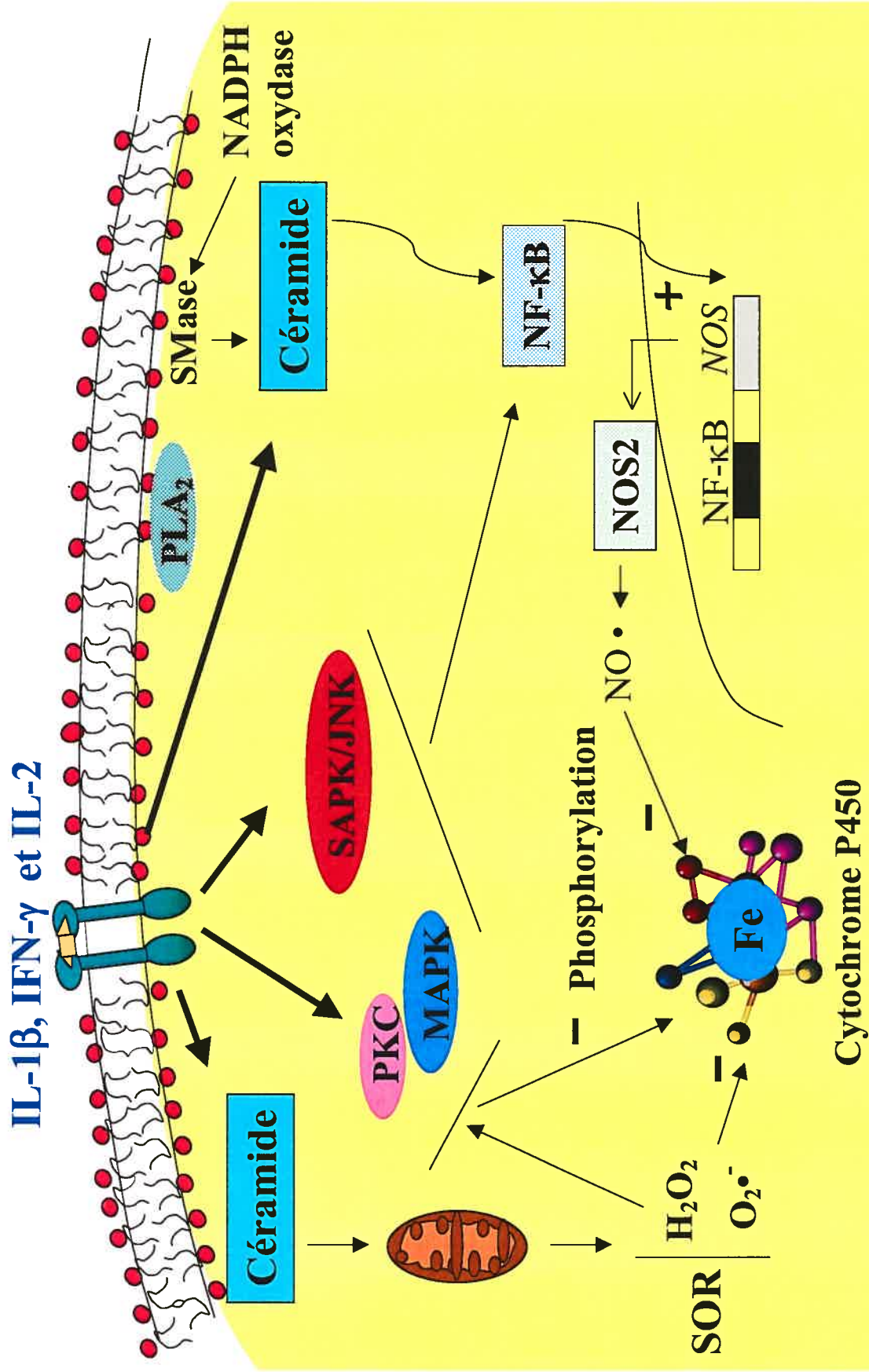
À continuation (Figure 9.1), nous proposons un modèle résumant les données disponibles permettant d'expliquer les mécanismes d'action sous-jacents à la diminution de l'activité des cytochromes P450 par l'hypoxie. La liaison des cytokines à leurs récepteurs active parallèlement plusieurs voies de signalisation qui vont conduire à la production de céramide et à l'activation de kinases. La céramide induit la formation de SOR dans les mitochondries qui par la suite peuvent réagir directement avec le cytochrome P450. De plus, les SOR sont des intermédiaires nécessaires à l'activation des MAPKs et du NF- κ B. L'activation des MAPKs peut culminer avec la phosphorylation du cytochrome P450. Par ailleurs, la céramide, tout comme les MAPKs, peut aussi activer directement le NF- κ B. Une fois activé, le NF- κ B subit une translocation dans le noyau, se lie au promoteur de *NOS2* et active sa transcription. L'induction de l'expression de *NOS2* va ainsi augmenter la production de NO^\bullet , qui à son tour pourra réagir avec le cytochrome P450 directement ou après sa transformation en peroxynitrite.

Figure 9.1

Mécanisme potentiels pouvant mener à la diminution de l'activité des cytochromes P450

La liaison d'une cytokine à son récepteur entraîne l'activation de plusieurs protéines impliquées dans les voies de transduction du signal. Par exemple, les cytokines peuvent activer la voie des MAPK (mitogen activated protein kinase), les protéine kinases activées par le stress/kinase c-jun (Moritz et coll., 1998; Kikuchi et coll., 1998), ou encore augmenter la production de céramide (Mathias et coll., 1998; Augé et coll., 2000). Via l'activation de facteurs de transcription ou la production de SOR (substances oxygénées réactives), chacune de ces voies de signalisation s'avère un mécanisme possible pouvant mener à la diminution de l'activité des cytochromes P450 (Eliasson et coll., 1994; Moritz et coll., 1998; Carballo et coll., 1999; Takabatake et coll., 2000).

Figure 9.1



B- Facteurs qui régulent l'expression des CYP1A1 et CYP1A2

Dans notre modèle, le sérum issu de lapins avec hypoxie diminue les ARNm codant pour les CYP1A1 et 1A2, phénomène qui provoque la baisse des protéines correspondantes dans les hépatocytes de lapins soumis à de l'hypoxie. Ces résultats suggèrent que les médiateurs sériques agissent par un mécanisme qui implique le contrôle transcriptionnel. Comme pour la diminution de l'activité des CYP1A1 et CYP1A2, l'IFN- γ , l'IL-1 β et l'IL-2 sont les médiateurs sériques responsables de leur régulation négative dans les hépatocytes de lapins avec hypoxémie. L'expression des CYP1A1 et CYP1A2 dans le foie est étroitement régulée par des protéines et des facteurs de transcription que les médiateurs sériques peuvent modifier. Ainsi, les voies de signalisation activées par l'hypoxie et/ou les cytokines peuvent contribuer à diminuer l'expression des CYP1A1 et CYP1A2 au moyen de plusieurs mécanismes de répression, à savoir : 1) la diminution des éléments potentialisateurs ou l'induction d'éléments répresseurs, 2) la diminution des facteurs nucléaires, 3) l'activation des éléments de régulation négative, et 4) l'inhibition post-transcriptionnelle.

Des données préliminaires de notre laboratoire démontrent que l'hypoxie *in vivo* ainsi que le sérum prélevé de lapins avec hypoxie diminuent aussi l'expression des isoformes CYP2B6, CYP2C9 et CYP2C19. Tout comme pour les CYP1A1 et CYP1A2, l'IFN- γ , l'IL-1 β et l'IL-2 sont les médiateurs sériques responsables de la régulation négative dans les hépatocytes de lapins avec hypoxémie. Ainsi, les mécanismes potentiels impliqués dans la régulation des CYP1A1 et CYP1A2 pourraient aussi être responsables de la régulation négative des CYP2B6, CYP2C9 et CYP2C19.

L'autorégulation du gène *CYP1A1* se fait par le biais de l'activation du récepteur AhR. Une fois activé par un ligand, le complexe se déplace au noyau pour se fixer au Arnt et au NF-1 (nuclear factor 1), un élément potentialisateur, et ainsi activer la transcription du gène *CYP1A1* (Barouki et Morel, 1998).

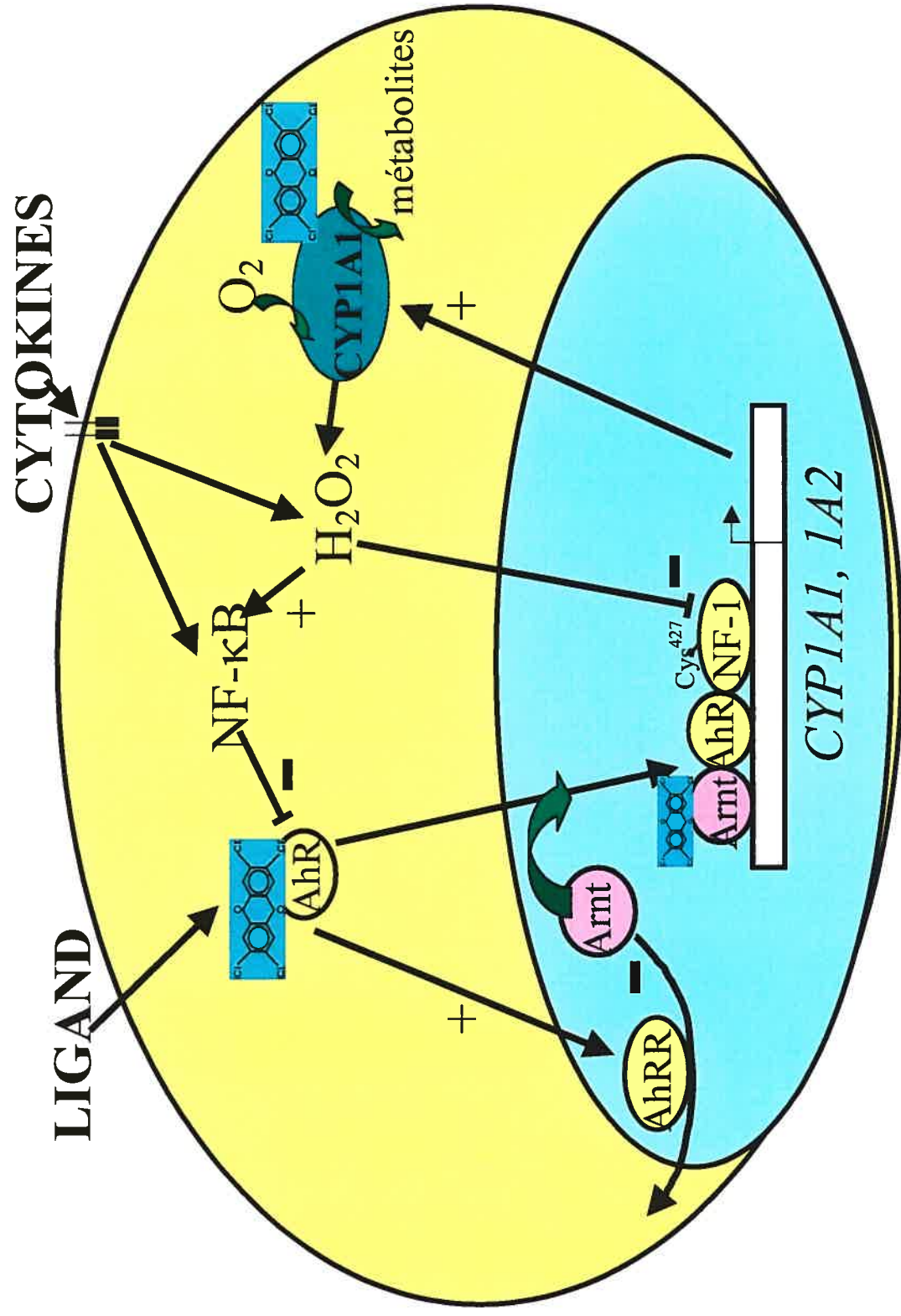
La transcription du *CYP1A1* peut tout d'abord être réprimée par la diminution d'éléments potentialisateurs ou l'induction d'éléments répresseurs. Ces éléments pourraient être inhibés et/ou activés par des stimuli tels l'hypoxie et les cytokines, secondairement à l'activation de voies de signalisation conduisant à la génération de SOR et à l'activation de NF- κ B (Barouki et Morel, 2001). Ces mécanismes de répression sont résumés dans la figure 9.2. La formation de SOR, tel le H₂O₂, module la liaison du NF-1 au promoteur du *CYP1A1* ayant comme effet de réprimer la transcription. L'ajout d'un antioxydant, comme le dithiocarbamate de pyrrolidine, inhibe l'effet du H₂O₂ sur la répression du CYP1A1 (Barouki et Morel, 2001). Par ailleurs, l'activation de NF- κ B par les cytokines ou par le H₂O₂ entraîne la diminution du récepteur AhR ce qui réduira aussi la transcription du *CYP1A1*. Finalement, la liaison du ligand au récepteur Ah peut aussi réprimer la transcription du *CYP1A1* puisque cette liaison induit le AhRR (aryl hydrocarbon receptor repressor), protéine qui entraîne la séquestration de Arnt. Cette séquestration de Arnt empêchera la formation du dimère AhR/Arnt ce qui aura comme effet de réprimer la transcription de *CYP1A1* (Barouki et Morel, 2001).

Figure 9.2

Autorégulation du *CYP1A1*

Influence de la liaison de cytokines à leur récepteurs sur la translocation du complexe AhR/ligand dans le noyau et sur la transcription du *CYP1A1*. Ce mécanisme implique des SOR (substances oxygénées réactives), tel le H_2O_2 , et le facteur de transcription NF- κ B (nuclear factor kappa B) (Adapté de Abdel-Razzak et coll., 1993).

Figure 9.2
Autorégulation du *CYP1A1*



L'hypoxie et les cytokines peuvent aussi agir sur l'expression des CYP1A1 et CYP1A2 en diminuant l'expression des facteurs nucléaires. Un des facteurs nucléaires clé dans l'expression des CYP1A est l'Arnt, cependant, Arnt s'avère aussi l'une des composante de l'hétérodimère HIF-1. En présence d'hypoxie, de SOR ou encore de cytokines, la sous-unité HIF-1 α , une fois stabilisée, est mobilisée dans le noyau pouvant ainsi se dimériser avec le HIF-1 β ou Arnt (Semenza, 2000; Wenger, 2002; Giatromanolaki et coll., 2003). Donc, lors d'hypoxie, l'activation de la sous-unité HIF-1 α recrute le facteur nucléaire Arnt et par le fait même, induit la régulation négative des CYP1A (Eguchi et coll., 1997; Backlund et coll., 1997). L'incubation d'hépatocytes de lapins témoins avec du cobalt, un activateur de HIF-1, produit aussi une régulation négative des CYP1A1 et 1A2, confirmant ainsi que l'activation du facteur de transcription HIF-1 diminue l'expression des CYP1A1 et 1A2 (Fradette et du Souich, 2003).

Un troisième mécanisme de répression des CYP1A1 et 1A2 se ferait par le biais de l'activation d'éléments de régulation négative. En réponse à l'hypoxie et autres stimuli, tels que les cytokines et les SOR, l'activation de voies de signalisation va conduire à la translocation de facteurs de transcription, vers le noyau ce qui conduira à la modulation de la synthèse de protéines. Bien que les facteurs de transcription sont fondamentalement des protéines qui stimulent la transcription d'un gène, certains ont aussi la capacité de produire l'effet contraire. L'AP-1 et le NF- κ B en sont deux exemples. L'hypoxie *in vivo* et les cytokines ont la capacité d'activer à la fois l'AP-1 et le NF- κ B (Auron, 1998; Handel et Girgis, 2001; Michiels et coll., 2002; Marden et

coll., 2003). L'augmentation de l'expression de ces protéines pourrait être associée à la régulation négative des CYP1A1 et CYP1A2 dans notre modèle d'hypoxie.

Le AP-1 est un facteur de transcription constamment présent dans la cellule qui est induit très rapidement par divers stimuli, tels l'hypoxie, les SOR et les cytokines (Karin et coll., 2001; Turpaev, 2002). Ces stimuli induisent l'assemblage des facteurs c-jun et c-fos en hétérodimère de façon à former le complexe AP-1 qui est alors capable de se lier à une séquence spécifique sur le promoteur d'un gène et ainsi activer la transcription (Shaulian et Karin, 2002; Turpaev, 2002).

Le AP-1 joue un rôle essentiel dans l'activation de la prolifération cellulaire (Shaulian et Karin, 2002). La fonction essentielle du AP-1 est d'induire la transcription de multiples gènes (Turpaev et coll., 2002). Toutefois, Abdel-Razzak et coll. ont démontré que la liaison de AP-1 au promoteur des *CYP1A* empêchait l'induction des CYP1A par les hydrocarbures polycycliques aromatiques (1993). De plus, AP-1 pourrait aussi être impliqué dans la répression des CYP1A par un autre mécanisme encore mal compris à ce jour. Effectivement, l'activation de AP-1 par la PKC pourrait tout simplement inactiver le complexe AhR/Arnt et prévenir sa liaison au promoteur des CYP1A (Abdel-Razzak et coll., 1993).

Nous avons démontré que l'hypoxie augmente l'expression de AP-1 et que son activation, par l'incubation d'hépatocytes de lapins témoins avec du plomb, diminue l'expression des CYP1A1 et 1A2 (Fradette et du Souich, 2003). Ces expériences

indiquent que l'activation de AP-1 par l'hypoxie est associée à la diminution des CYP1A1 et CYP1A2.

Le facteur de transcription NF- κ B est aussi activé par de nombreux stimuli telles que l'hypoxie, les SOR ou les cytokines (Malinin et coll., 1997; Wesselborg et coll., 1997). Tout comme le AP-1, le NF- κ B est surtout reconnu en tant qu'inducteur de la transcription, mais l'effet contraire a aussi été observé pour les CYP2C11 et CYP1A1 du cytochrome P450. Le promoteur du *CYP2C11* contient un site spécifique de liaison pour le NF- κ B. Une mutation dans ce site bloque la liaison du NF- κ B et abolit ainsi la suppression de la transcription du *CYP2C11* par l'IL-1 β (Iber et coll., 2001). Tel que mentionné précédemment, le NF- κ B peut également interagir avec le récepteur AhR (Tian et coll., 1999) et ainsi diminuer l'expression des CYP1A.

Puisque toutes les conditions décrites dans notre étude, c'est-à-dire l'hypoxie, le sérum provenant de lapins avec hypoxie, le plomb et le cobalt peuvent activer le NF- κ B (Haddad, 2002; Wang et coll., 2002; D'Angio et Finkelstein, 2000; Pyatt et coll., 1996; Goebler et coll., 1995), il est fort possible que ce dernier pourrait aussi contribuer à la régulation négative des CYP1A1 et 1A2 lors de l'hypoxie. Le NF- κ B, étant lui aussi activé par les cytokines, exercerait un effet plus prononcé dans les hépatocytes d'animaux avec hypoxie puisqu'il y a une plus grande concentration de récepteurs membranaires aux cytokines (Simms et D'Amico, 1996; Takabatake et coll., 2000). Ceci expliquerait donc l'absence de répression des CYP1A1 et CYP1A2 par le sérum dans les hépatocytes de lapins témoins.

Finalement, les cytokines et les SOR induits par l'hypoxie peuvent affecter la stabilité des ARNm, la traduction ou encore stimuler la dégradation des isoformes. Tous ces mécanismes pourraient ainsi causer une régulation négative des CYP1A. Un exemple d'une cytokine pouvant agir de cette sorte est l'IFN- γ . Calleja et coll. (1998) ont proposé que l'IFN- γ pouvait promouvoir la dégradation et/ou la diminution de la traduction de certains cytochromes P450. De plus, la modification post-traductionnelle secondaire à la phosphorylation, produite par les voies de signalisation des cytokines, peut non seulement inactiver les cytochromes P450, mais aussi dénaturer l'hémoprotéine menant ainsi à leur régulation négative (Bernhardt, 1996; Morgan, 1997).

Les mécanismes potentiels sous-jacents à la diminution de l'expression des CYP1A1 et CYP1A2 peuvent être illustrés par un modèle (Figure 9.3) et comme exposé à continuation :

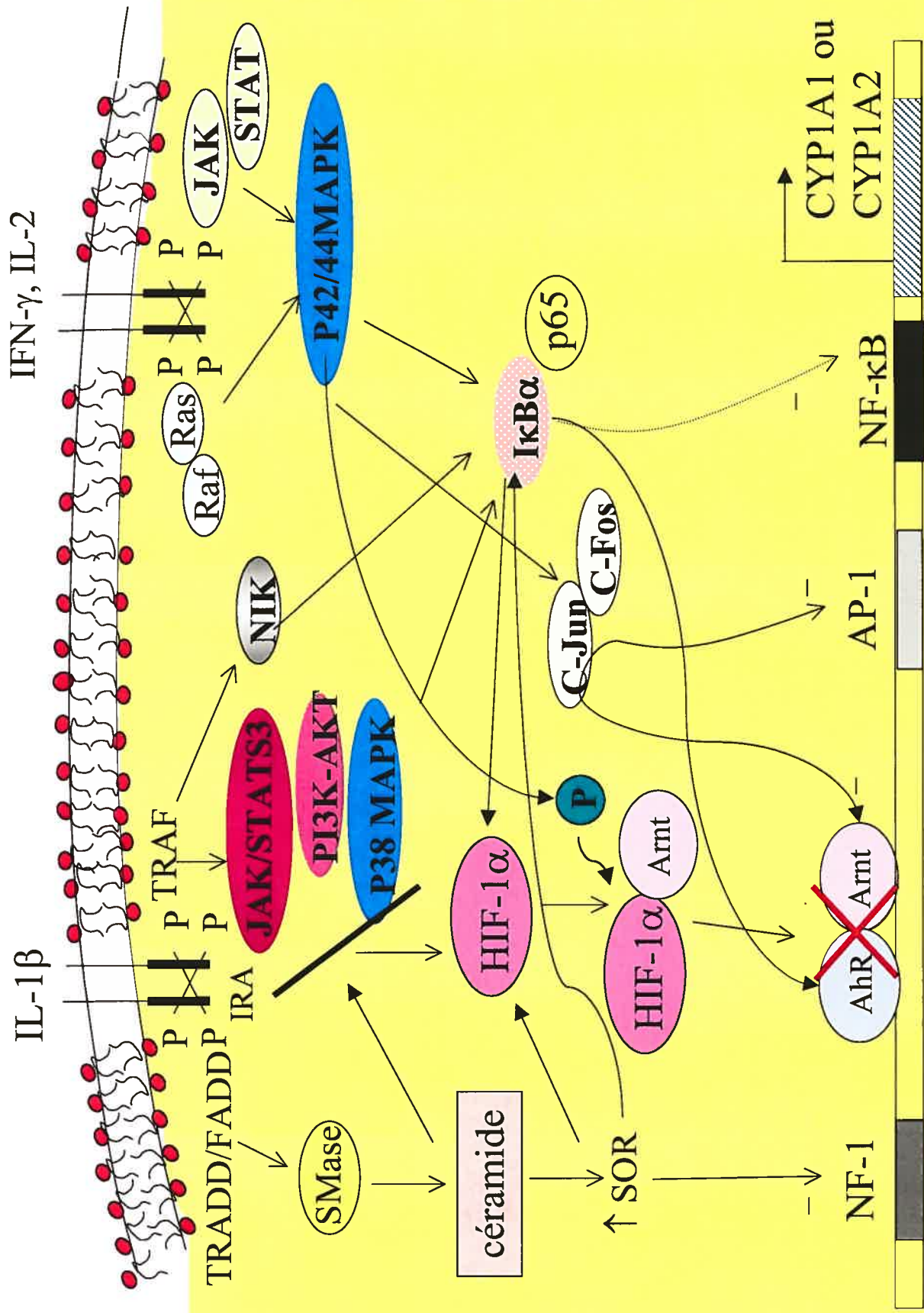
- 1) La liaison de cytokines à leur récepteur entraîne le recrutement de molécules adaptrices telles TRADD et FADD qui vont activer la sphingomyelinase (SMase) et ainsi augmenter la production de céramide dans la cellule. La céramide induit, à son tour, la formation de SOR dans les mitochondries, qui peuvent limiter la liaison de NF- κ B au promoteur du gène du *CYP1A1* et diminuer la transcription.

Figure 9.3

Voies de signalisation activées par les cytokines qui potentiellement vont moduler l'expression des CYP1A1 et CYP1A2.

Schéma représentant l'effet des cytokines sur l'expression des CYP1A1 et CYP1A2 (Auron, 1998; Fradette et coll., 2002; Fradette et du Souich, 2003), et les voies de signalisation potentielles activées (Abdel-Razzak et coll., 1994; Semenza, 2000; Karin et coll., 2001; Marde et coll., 2003; Fradette et du Souich, 2003). Cette figure est donc constituée d'un résumé des données de la littérature complémenté par nos résultats dans laquelle AhR signifie "aryl hydrocarbon receptor", Arnt signifie "aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator", AP-1 signifie "activator protein-1", HIF-1 α signifie "hypoxia-inducible factor-1 alpha", IFN- γ signifie interféron gamma, IL-1 β signifie interleukin-1 beta, IL-2 signifie interleukin-2, IRAK signifie "interleukin-1 receptor associated kinase", JAK signifie "janus tyrosine kinase", MAPK signifie "mitogen-activated protein kinases", NF1 signifie "nuclear factor 1", NF- κ B signifie "nuclear factor kappa B", NIK signifie "nuclear factor kappa B inducing kinase", NOS signifie oxide nitric synthase, PI3K signifie phosphatidylinositol 3 kinase, PKA signifie protéine kinase A, PKC signifie protéine kinase C, PLC signifie phospholipase C, SOR signifie substances oxygénées réactives, STAT signifie "signal transduction and activation of transcription protein" et TRAF signifie "tumour necrosis factor receptor associated factor".

Figure 9.3
Voies de signalisation activées par les cytokines qui potentiellement vont moduler l'expression
des CYP1A1 et CYP1A2



- 2) La liaison de cytokines à leurs récepteurs induit directement par les molécules adaptrices TRAF et JAK ou indirectement par le biais de la céramide l'activation de plusieurs kinases, facteurs de transcription et augmente la production de SOR. L'activation de kinases, du NF- κ B et l'augmentation de SOR provoquent, entre autres, la stabilisation de HIF-1 α . Le HIF-1 α va ensuite se dimériser avec Arnt et ainsi empêcher la formation du dimère AhR/Arnt, ce qui va diminuer la transcription des *CYP1A*.
- 3) L'activation du facteur de transcription AP-1 par des kinases pourrait inactiver le dimère AhR/Arnt et ainsi prévenir sa liaison au promoteur et/ou la transactivation du gène *CYP1A*. AP-1 peut aussi directement se lier au promoteur des *CYP1A* et supprimer la transcription.
- 4) Finalement, les MAPKs peuvent activer NF- κ B qui va migrer au noyau, se lier au promoteur des *CYP1A* et empêcher sa transcription. Le NF- κ B peut aussi diminuer l'expression de AhR ce qui réprime la transcription du *CYP1A1*.

C- Facteurs qui régulent l'expression du CYP3A6

L'hypoxie *in vivo* ainsi que le sérum provenant de lapins avec hypoxie *in vitro* induisent l'ARNm du *CYP3A6* de même que l'expression de sa protéine (Kurdi et coll., 1999; Fradette et coll., 2002). En bloquant dans le sérum l'érythropoïétine par immunoneutralisation, nous avons partiellement évité l'augmentation de l'expression du CYP3A6. Cette observation démontre que l'induction du CYP3A6 dépend en partie de l'érythropoïétine.

L'expression du CYP3A4 est modulée par les récepteurs nucléaires CAR et PXR. Le groupe de Negishi a démontré, par des expériences de mutagénèse dirigée et de transfection dans des hépatocytes, la présence de séquences spécifiques dans le promoteur du *CYP3A4* qui seraient impliquées dans la modulation de son expression sous l'effet d'inducteurs pharmacologiques (Negishi et coll., 1996; Honkakoski et coll., 1998). Il est maintenant reconnu que ces séquences fixent plusieurs types de récepteurs nucléaires présentés sous la forme d'hétérodimères avec le récepteur RXR (Honkakoski et coll., 1998). Ainsi, CAR, un récepteur orphelin enrichi dans le foie, fait partie d'un complexe hétérodimérique avec RXR. CAR est habituellement retrouvé dans le cytosol. Sous l'effet d'un inducteur, CAR subit une translocation au noyau où il va former un complexe hétérodimérique avec RXR pour aller se lier à l'ADN. La liaison de ce complexe au promoteur va ainsi induire la transcription du *CYP3A4* (Dogra et coll., 1998; Kawamoto et coll., 1999; Sueyoshi et Negishi, 2001). Outre CAR, un autre membre de la famille des récepteurs nucléaires, le récepteur PXR, se lie à des séquences spécifiques du promoteur et transactive le gène *CYP3A* en réponse à des inducteurs

spécifiques (Moore et coll., 2000). Comme CAR, PXR forme un hétérodimère avec RXR pour induire la transcription du gène (Sueyoshi et Negishi, 2001; Moore et coll., 2000). Puisque les récepteurs nucléaires CAR et PXR contrôlent l'expression du CYP3A en présence d'inducteurs pharmacologiques, il était donc intéressant de vérifier si l'hypoxie pouvait modifier l'activité de ces deux récepteurs. Il s'est avéré que l'hypoxie *in vivo* induisait l'expression de CAR ainsi que sa liaison au promoteur du *CYP3A6*. Par contre, l'hypoxie ne modifie pas l'expression de PXR. Quant au sérum provenant de lapins avec hypoxie, il n'induit pas la liaison de CAR et PXR au promoteur du *CYP3A6*. Ces résultats suggéraient que CAR pourrait contribuer à l'induction du CYP3A6 lors de l'hypoxie *in vivo*.

Tel que mentionné précédemment, l'hypoxie *in vivo* entraîne l'activation du facteur de transcription HIF-1 (Salceda et coll., 1997). En accord avec ces données, nous avons confirmé que l'hypoxie *in vivo* ainsi que le sérum *in vitro* augmentent l'expression et activent les facteurs de transcription HIF-1 et AP-1. L'étude du promoteur du CYP3A6 nous avait permis de mettre en évidence deux sites de liaison reconnus par deux facteurs de transcription, le HIF-1 et l'AP-1, induits par l'hypoxie. Nous avons démontré que l'hypoxie *in vivo* ainsi que le sérum provenant de lapins avec hypoxie provoque la liaison de HIF-1 au promoteur du CYP3A6 et induit sa transactivation.

Plusieurs explications peuvent être suggérées pour comprendre comment le sérum provenant de lapins avec hypoxie pourrait activer l'hétérodimère HIF-1 α /Arnt. Premièrement, il a été démontré que des cytokines et des facteurs de croissances, tels

l'IL-1 β , le TNF- α , l'EGF (epidermal growth factor), l'angiotensin II, le TGF- β (transforming growth factor β_1) et le HGF (hepatocyte growth factor), sont capables de stabiliser et d'augmenter la quantité de HIF-1 α possiblement par la génération de SOR produite par la céramide (Wenger, 2002). Deuxièmement, la stabilisation de HIF-1 α par les cytokines pourrait aussi se produire suite à l'activation de NF- κ B par les MAPKs (Jung et coll., 2003). Ainsi, il a été démontré que la stabilisation et l'induction de HIF-1 α dépend de l'activité de la p38MAPK (Duyndam et coll., 2003). Une fois l'hétérodimère HIF-1 α /Arnt fixé au promoteur du *CYP3A6*, sa transactivation exige une phosphorylation réalisée par les p42/p44 MAPKs qui conduit à l'augmentation de l'expression du *CYP3A6*. L'inhibition spécifique des p42/p44 MAPKs par le PD98059 empêche l'augmentation de l'expression du *CYP3A6*, mais n'affecte pas l'expression de HIF-1 ni sa liaison au promoteur du *CYP3A6*. En tenant compte des résultats de Duyndam et coll., nous pourrions spéculer que la présence de HIF-1 est associée à la voie des p38 MAPK, tandis que son activité serait associée à la voie des p42/p44 MAPKs.

En présence d'hypoxie, l'augmentation de calcium intracellulaire active les p42/44 MAPKs, kinases essentielles à l'activation de c-fos et c-jun, les deux composantes de AP-1 (Halazonetis et coll., 1988; Bressler et coll., 1999). Une fois activé, l'hétérodimère c-fos/c-jun se fixe alors sur la séquence spécifique du promoteur du *CYP3A6* et induit sa transactivation.

Pour expliquer comment le sérum provenant de lapins avec hypoxie pourrait activer le AP-1, nous avons postulé que les cytokines sont responsables de cette

activation. Cette hypothèse est basée sur le fait qu'il a été démontré que des cytokines et des facteurs de croissances, tels l'IL-1 β , le TNF- α , l'EGF et l'IGF-1, sont capables d'activer le facteur de transcription AP-1 à travers les voies des MAPKs (Burns et coll., 2000; Yuasa et coll., 1998; Kanakaraj et coll., 1998). Plus spécifiquement, la liaison de cytokines aux récepteurs membranaires conduit à l'activation de la cascade de MAPK N-terminal kinase de c-jun appelée aussi protéine kinase activée par le stress (JNK/SAP) (Gozal et coll., 1999; Michiels et coll., 2000). La phosphorylation de c-jun augmente non seulement la quantité de AP-1, mais aussi sa capacité d'activateur de transcription (Bressler et coll., 1999). Nos observations confirment le rapport de Bressler et coll. puisque l'inhibition spécifique des p42/p44 MAPKs par le PD98059 empêche l'augmentation de AP-1, ainsi que sa liaison au promoteur du *CYP3A6*. De ce fait, l'inhibition des p42/p44 MAPKs prévient l'augmentation de l'expression du *CYP3A6* dans les hépatocytes.

En résumé, nous postulons que l'augmentation du *CYP3A6* par l'hypoxie *in vivo* pourrait être expliqué par trois mécanismes d'action (figure 9.4) :

- 1- Par l'augmentation des SOR via la NADPH oxydoréductase, l'hypoxie inhibe le système ubiquitine/protéosome, ce qui aura comme effet de stabiliser la sous-unité HIF-1 α . Une fois stabilisé, le HIF-1 α migre au noyau où il se dimérise avec Arnt. L'hétérodimère HIF-1 se fixe alors sur une séquence spécifique du promoteur du *CYP3A6* (5'-CACGTGGG-3' située entre -831 et -824 bp) et induit sa transcription. L'activation de HIF-1 est secondaire à une phosphorylation par les p42/p44 MAPKs.

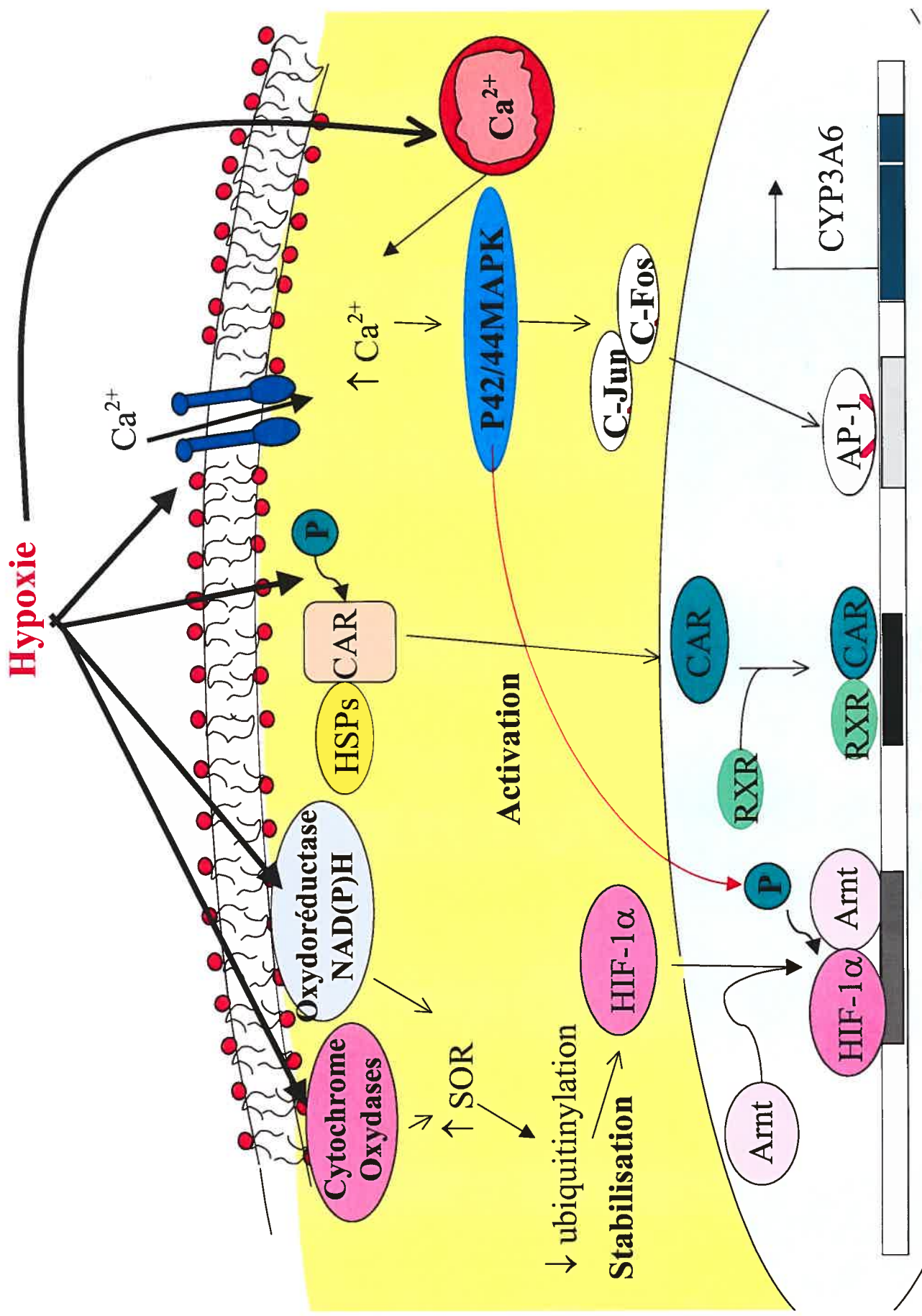
Figure 9.4

Voies de signalisation activées par les cytokines qui potentiellement dans l'induction du CYP3A6 par l'hypoxie *in vivo*.

Schéma représentant l'effet de l'hypoxie sur l'expression du CYP3A6 (Fradette et coll., 2002; Fradette et du Souich, 2003), et les voies de signalisation potentiellement activées (Negishi et coll., 1996; Salceda et coll., 1997; Dogra et coll., 1998; Gozal et coll., 1999; Sueyoshi et coll., 1999; Bressler et coll., 1999; Moore et coll., 2000; Wenger, 2002; Fradette et du Souich, 2003). Cette figure est donc constituée d'un résumé des données de la littérature complété par nos résultats. Arnt signifie "aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator", AP-1 signifie "activator protein-1", Ca^{2+} signifie calcium, HIF-1 α signifie "hypoxia-inducible factor-1 alpha", HSP signifie "heat shock protein", JAK signifie "janus tyrosine kinase", MAPK signifie "mitogen-activated protein kinases", PI3K signifie phosphatidylinositol 3 kinase, SOR signifie substances oxygénées réactives, STAT signifie "signal transduction and activation of transcription protein" et RXR signifie "retinoid X receptor".

Figure 9.4

Voies de signalisation potentiellement impliquées dans l'induction du CYP3A6 par l'hypoxie *in vivo*



- 2- Dans le cytosol de la cellule, CAR forme un complexe inactif avec des HSPs (heat shock proteins). L'hypoxie induit la phosphorylation du complexe, ce qui libère et active CAR. Une fois activé, CAR est transloqué au noyau où il forme un hétérodimère avec RXR. Par la suite, l'hétérodimère se fixe à une séquence spécifique du promoteur (5'-ACATGAACTCAGAGGAGGT CACCACGG située entre -140 et -170 bp) et induit la transcription.
- 3- *In vivo*, l'hypoxie augmente le calcium intracellulaire soit par l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants de type L ou par le relargage de calcium provenant des réserves intracellulaires. L'augmentation de calcium intracellulaire active les p42/p44 MAPKs, kinases essentielles à l'activation de c-fos et c-jun. L'hétérodimère AP-1 (c-jun/c-fos) migre au noyau où il se fixera à une séquence spécifique du promoteur (5'-TGA TCC-3' située entre -109 et -103 bp) et induira la transcription du *CYP3A6*.

Pour expliquer l'induction du CYP3A6 par le sérum provenant de lapins avec hypoxémie, nous proposons le modèle présenté dans la figure 9.5. Deux facteurs de transcription sont à la source de l'induction du CYP3A6 dans notre modèle, le HIF-1 et l'AP-1, qui sont activés par plusieurs voies de signalisation induites par des cytokines :

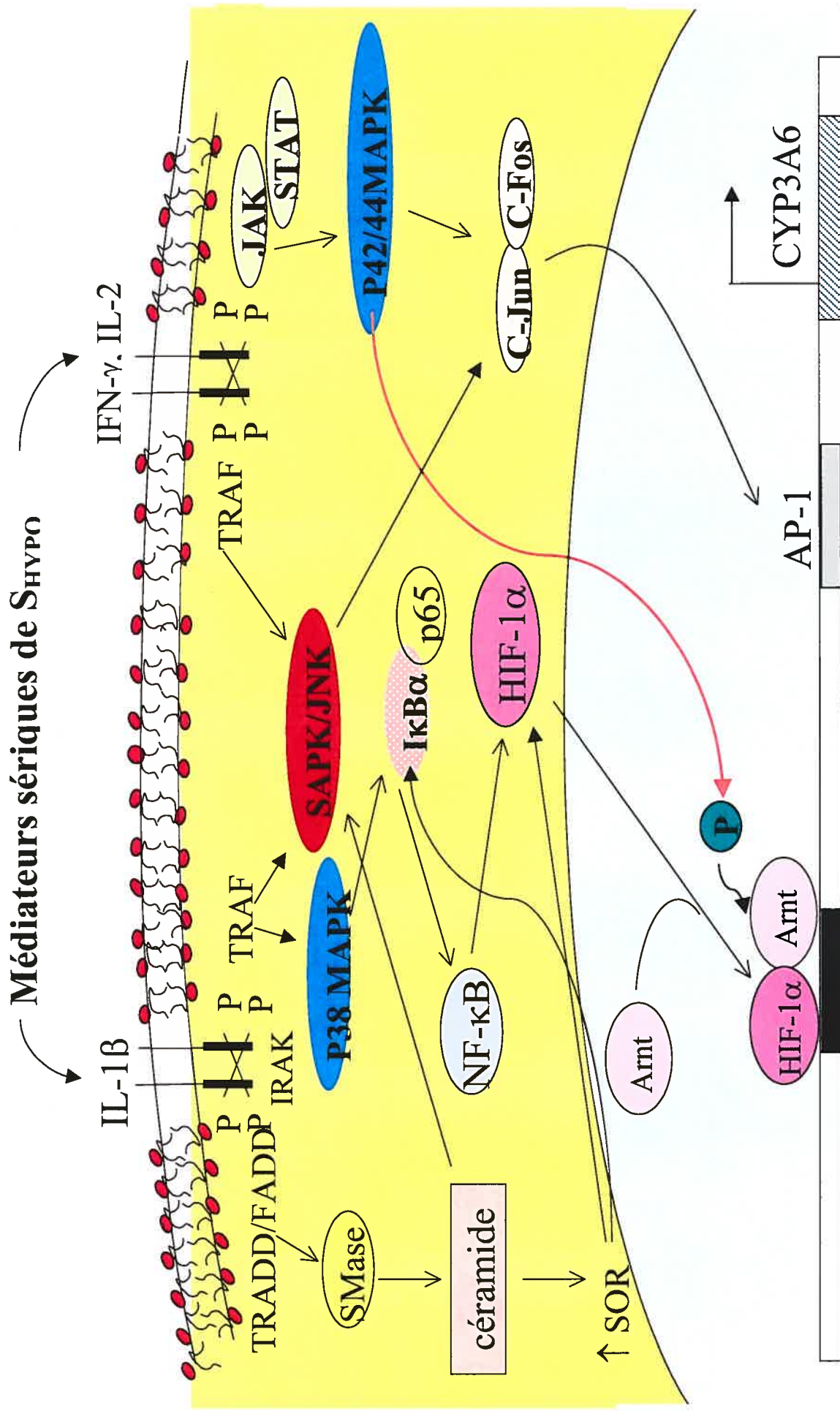
- 1- Tel que mentionné précédemment, le recrutement des molécules adaptrices TRADD et FADD vont induire la formation de SOR dans les mitochondries par le biais de l'activation de la céramide. Les SOR vont par la suite inhiber le système ubiquitine/protéosome et/ou activer le NF- κ B, ce qui conduit à la stabilisation de HIF-1 α . Alternativement, la p38 MAPK, activée par la molécule adaptrice TRAFF, peut également activer NF- κ B via la phosphorylation de la protéine inhibitrice I κ B et ainsi stabiliser le HIF-1 α . Par la suite, il y a formation de l'hétérodimère HIF-1 qui se fixe sur une séquence spécifique du promoteur du *CYP3A6* (5'-CACGTGGG-3' située entre -831 et -824 bp). Finalement, la transactivation du *CYP3A6* requiert vraisemblablement la phosphorylation de l'hétérodimère HIF-1 par les p42/p44 MAPK.
- 2- L'activation du facteur de transcription AP-1 se produit par le biais d'une phosphorylation engendré par des MAPKs JNK/SAP ou des p42/p44 MAPKs. En se liant à une séquence spécifique du promoteur du *CYP3A6* (5'-TGACTCC-3' située entre -109 et -103 bp), AP-1 induit lui aussi la transcription.

Figure 9.5

Voies de signalisation activées par les cytokines qui potentiellement vont moduler l'expression des CYP1A1 et CYP1A2.

Schéma représentant l'effet du sérum provenant de lapins soumis à de l'hypoxie (S_{HYPO}) sur l'expression du CYP3A6 (Fradette et coll., 2002; Fradette et du Souich, 2003), et les voies de signalisation potentiellement activées (Abdel-Razzak et coll., 1994; Michiels et coll., 2000; Semenza, 2000; Moore et coll., 2000; Karin et coll., 2001; Wenger, 2002; Marde et coll., 2003; Fradette et du Souich, 2003). Cette figure est donc constituée d'un résumé des données de la littérature complémenté par nos résultats. AP-1 signifie "activator protein-1", HIF-1 α signifie "hypoxia-inducible factor-1 alpha", IFN- γ signifie interféron gamma, IL-1 β signifie interleukin-1 beta, IL-2 signifie interleukin-2, IRAK signifie "interleukin-1 receptor associated kinase", JAK signifie "janus tyrosine kinase", JNK signifie "c-jun N-terminal kinase" MAPK signifie "mitogen-activated protein kinases", NF- κ B signifie "nuclear factor kappa B", SOR signifie substances oxygénées réactives, SAPK signifie "stress-activated protein kinases", STAT signifie "signal transduction and activation of transcription protein" et TRAF signifie "tumour necrosis factor receptor associated factor".

Figure 9.5
Voies de signalisation potentiellement impliquées dans l'induction du CYP3A6 par S_{HYPO}



II- Mécanismes sous-jacents à la régulation de l'expression du cytochrome P450 par d'autres pathologies : différences avec l'hypoxie.

Bien que les cytokines sont impliquées de manière primordiale dans la répression, l'inactivation et l'induction du cytochrome P450, il faut souligner que n'importe quelle agression, comme par exemple l'hypoxie, provoque un stress conduisant à des changements dans la concentration de multiples hormones telles les glucocorticoïdes et d'amines endogènes, telle la noradrénaline, qui sont capables d'influencer l'expression du P450. Ainsi, les glucocorticoïdes exercent un effet bimodal sur le cytochrome P450. À faibles concentrations, les glucocorticoïdes induisent le CYP2C, mais à fortes doses, ils le supprime (Morgan, 1997). Pour ce qui est de la noradrénaline, ses récepteurs β_1 , β_2 et β_3 dans le foie sont couplés à l'activation de l'adénylate cyclase qui entraîne la formation de AMPc et l'activation de la PKA. La PKA empêche l'induction des CYP2B par le phénobarbital (Sidhu et Omiecinski, 1995). Des recherches plus approfondies s'imposent afin de mieux définir la contribution de ces substances endogènes dans le contrôle du P450 dans le contexte de l'hypoxie.

Outre l'hypoxie, plusieurs états pathologiques comme le cancer, l'insuffisance rénale et l'inflammation sont susceptibles d'influencer le métabolisme des médicaments. Grant et coll. ont démontré que l'addition de sérum de patients cancéreux à des hépatocytes en culture réduit le contenu total en cytochrome P450 et le

métabolisme de la testostérone (Grant et coll., 2001). De plus, l'analyse du contenu hépatique en CYP27A, isoforme impliquée dans l'activation de la vitamine D, a permis de démontrer que chez des patients atteints d'un carcinome hépatique cette isoforme est induite (Gascon-Barré et coll., 2001). Par ailleurs, chez le rat avec insuffisance rénale chronique, le contenu total en cytochrome P450, la N-déméthylation de l'érythromycine ainsi que les concentrations en ARNm des *CYP2C11*, *CYP3A1* et *CYP3A2* et des protéines correspondantes sont tous diminués (Leblond et coll., 2001). Le sérum de rats atteints d'une insuffisance rénale reproduit tous les effets observés *in vivo* (Guévin et coll., 2002). L'étude des effets des maladies sur le cytochrome P450 permettra de mieux comprendre les mécanismes et les facteurs impliqués dans la régulation de l'expression des différents cytochromes P450.

Les infections virales des voies respiratoires supérieures diminuent la clairance de la théophylline (du Souich et coll., 1978). Le sérum de sujets avec une infection virale des voies respiratoires supérieures réduit l'activité et l'expression de plusieurs cytochromes P450 lorsqu'incubé avec des hépatocytes. Chez le lapin, la réaction inflammatoire provoquée par l'injection sous-cutanée de térébenthine entraîne une réduction des niveaux d'ARNm et de protéines des CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6, ce qui se traduit par une réduction du métabolisme de la théophylline et du DFB (3,4-difluorobenzyloxy-5,5diméthyl-4-(4-méthylsulfonyl-phenyl)-(5H)-furan-2-one), une sonde utilisée pour mesurer l'activité du CYP3A (El-Kadi et coll., 1997; Bleau et coll., 2001; Bleau et coll., 2003). Nous avons démontré que le sérum de lapins avec une réaction inflammatoire et celui d'humains souffrant d'une infection virale des voies respiratoires supérieures contiennent l'IFN- γ , l'IL-6, l'IL-1 β et le TNF- α qui sont

responsables de la diminution de l'activité et de l'expression des cytochromes CYP1A1, CYP1A2 et CYP3A6. Nous avons aussi démontré que lors de l'inflammation, la réduction de l'activité du cytochrome P450 est un phénomène qui précède la répression. La réduction de l'expression des cytochromes P450 se fait principalement au niveau transcriptionnel, ce qui explique la baisse des protéines (Bleau et coll., 2000; Bleau et coll., 2001; Bleau et coll., 2003).

Les voies de signalisation conduisant à la diminution de l'activité des cytochromes P450 par l'inflammation sont partiellement élucidées. La phlorétine (inhibiteur non-spécifique de la PTK), l'amino-2 purine (inhibiteur spécifique des kinases qui phosphorylent les PKR activés par l'ARN), le bis-indolmaléimide (inhibiteur de la PKC) et le PD98059 (inhibiteur spécifique des MAPKs p42/p44) préviennent la diminution du cytochrome P450 total induite par le sérum de lapins et d'humains souffrant d'une réaction inflammatoire. Ces résultats suggèrent que la diminution de l'activité du cytochrome P450 est associée à l'activation des voies de signalisation dépendantes des PTK, des PKC et des MAPKs (Levitchi et coll., manuscrit en préparation).

Comme pour l'hypoxie, puisque les médiateurs sériques modulant le cytochrome P450 lors d'une réaction inflammatoire sont des cytokines, les voies de signalisation responsables de la modulation des cytochromes P450 pourraient-elles être les mêmes pour ces deux pathologies ? Lors de l'hypoxie, la diminution de l'activité et de l'expression des CYP1A1 et CYP1A2 est régulée par plusieurs mécanismes. Parmi ces mécanismes, un dépend des cytokines. Il est donc probable que les voies de

signalisation activées par les cytokines pendant l'hypoxie soient similaires aux voies de signalisations activées par la réaction inflammatoire, puisqu'elles impliquent les mêmes cytokines. Cependant, la modulation du CYP3A6 par ces deux pathologies doit présenter d'importantes différences puisque l'expression du CYP3A6 est diminuée lors d'une réaction inflammatoire, alors qu'elle est induite en présence d'hypoxie. Ainsi, même si ces deux pathologies sont caractérisées par la présence de cytokines comme médiateurs sériques, des différences existent entre les mécanismes d'action sous-jacents à l'inflammation et ceux sous-jacents à l'hypoxie. Par exemple, la diminution des CYP3A observée lors d'une réaction inflammatoire serait secondaire à la diminution, par les cytokines, des récepteurs nucléaires CAR et PXR (Pascussi et coll., 2000), tandis que lors d'hypoxie *in vivo*, l'expression des CYP3A est induite, en partie, par une augmentation de CAR (Fradette et du Souich, 2003). Ces exemples démontrent que selon la pathologie, les cytokines vont activer spécifiquement certaines voies de signalisation afin de moduler différemment les cytochromes P450.

In vivo, l'effet de l'association de l'hypoxie à une FiO_2 de 10% à la réaction inflammatoire produite par la térébenthine sur le cytochrome P450 n'est pas additif, l'effet est même inférieur à celui de chaque condition expérimentale isolée. La formation de l'acide 1,3 diméthylurique (1,3DMU), un des métabolites de la théophylline produits par les CYP1A1 et 1A2, n'est pas affectée alors que l'expression de ces protéines diminue. Pour ce qui est de l'expression du CYP3A6, elle est légèrement plus élevée que celle des lapins témoins. Il est donc possible que l'inflammation et l'hypoxie combinées préservent ou même augmentent l'expression de d'autres cytochromes P450, ce qui pourrait procurer des voies alternatives de

biotransformation à la théophylline (Kurdi et coll., 1999). Plusieurs mécanismes pourraient expliquer la préservation/augmentation d'enzymes du cytochrome P450 par l'association hypoxie/inflammation. Par exemple, les cellules T sont nécessaires à la répression du cytochrome P450 pendant l'inflammation, mais l'hypoxie inhibe la fonction de ces cellules ce qui pourrait se traduire par une diminution de la production de cytokines (Meehan, 1987; Topfer et coll., 1995). De plus, l'hypoxie peut diminuer certains médiateurs et mécanismes intracellulaires requis pour la répression du cytochrome P450 par l'inflammation tels le TNF- α , l'IL-1 α et le H₂O₂ (Wibbenmeyer et coll., 1995; Matuschak et coll., 1996).

À ce jour, les états pathologiques connus pour influencer le métabolisme des médicaments sont généralement associés à la diminution de l'activité et/ou de l'expression des cytochromes P450. Cette affirmation a toutefois quelques exceptions, dont l'hypoxie. En effet, tel que décrit tout au long de cette thèse, l'hypoxie induit l'expression du CYP3A6. Cette différence soulève une question : pourquoi l'hypoxie produit-elle une induction de l'expression du CYP3A6, alors que d'autres pathologies le diminuent ? Nous spéculons que l'organisme régule les enzymes du cytochrome P450 à son avantage.

III. La production de NO[•], un nouveau rôle physiologique du cytochrome P450?

En 1993, Renaud et coll. (1993) ont rapporté que la sous-famille 3A du cytochrome P450 pouvait catalyser la formation de NO[•] à partir de la N-hydroxy-arginine. Des travaux plus récents du même groupe suggèrent aussi que le cytochrome P450 pourrait utiliser d'autres substrats pour générer le NO[•] (Morgan et coll., 2001). En sachant qu'en présence d'hypoxie, de multiples mécanismes d'homéostasie sont activés afin de garantir la survie tissulaire, nous avons émis l'hypothèse que l'induction du CYP3A6 durant l'hypoxie avait pour conséquence d'augmenter la production de NO[•] afin de produire une vasorelaxation locale. En tentant de confirmer cette hypothèse, nous avons démontré que les CYP2C9, CYP2C19 et CYP2B6 génèrent de l'hydroxylamine à partir de la sérotonine et que l'hydroxylamine, en présence de catalase, est convertie en NO[•]. Cette observation est intéressante pour deux raisons : 1) la seule voie connue de biotransformation de la sérotonine était celle de la monoamine oxydase A (MAO A), et nos résultats démontrent que plusieurs cytochromes P450 peuvent transformer la sérotonine en 5-hydroxy-indole-acétique, et 2) la seule source endogène connue de NO[•] était la biotransformation de la L-arginine par la NOS, et nous démontrons que le cytochrome P450 peut produire du NO[•], en présence de catalase, à partir de la sérotonine.

Dans cette section, nous allons tout d'abord faire un bref résumé des connaissances au sujet de la sérotonine, ainsi que sur les effets et données de la

littérature qui nous ont poussés à émettre l'hypothèse qu'elle était le substrat utilisé par le cytochrome P450 pour générer de NO^\bullet . Par la suite, nous discuterons de l'impact de nos observations, à savoir que le cytochrome P450 produit du NO^\bullet à partir de la sérotonine, sur la compréhension et le traitement de certaines pathologies.

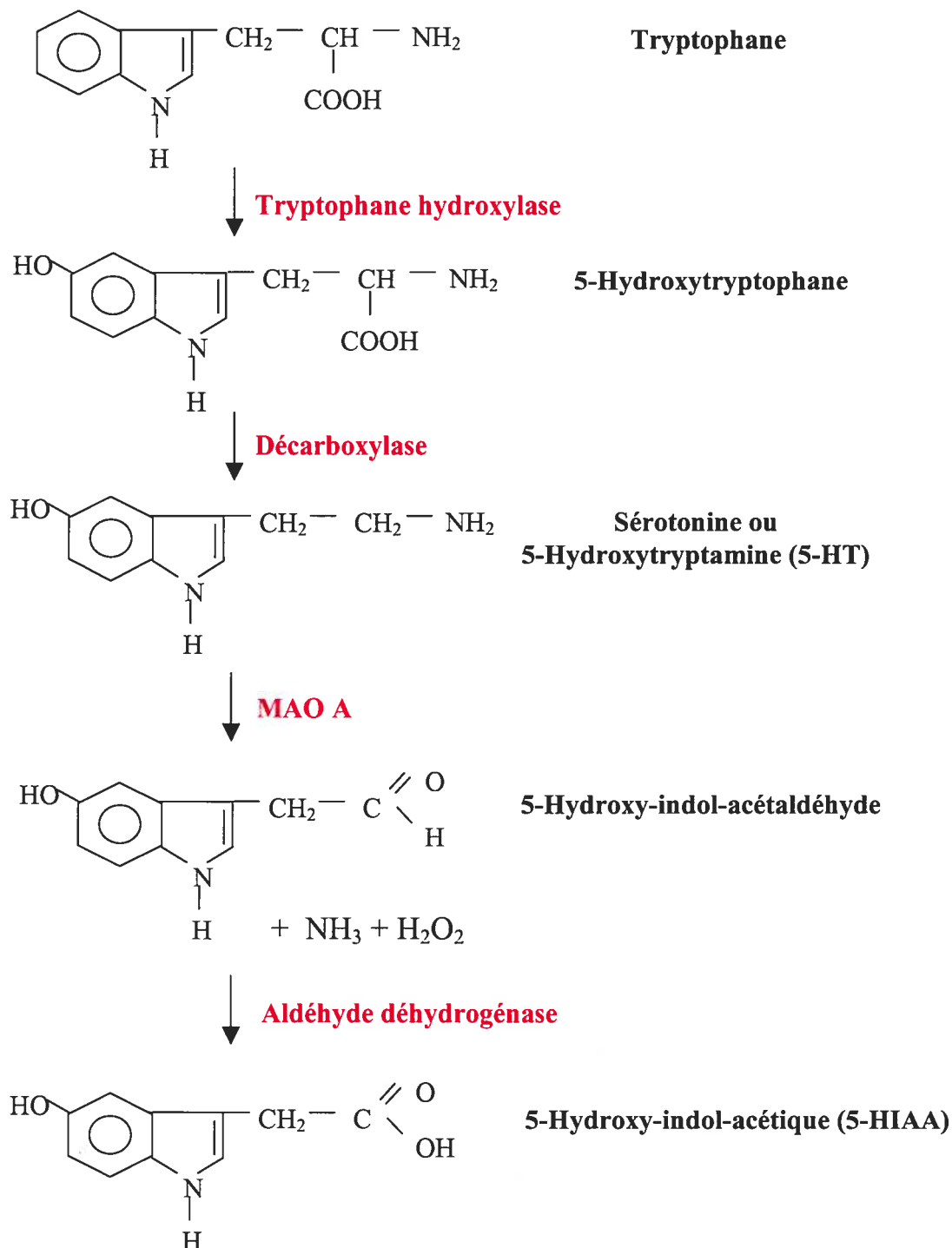
La présence d'un facteur vasotonique dans le sang était pressentie dès le début du 19^e siècle, mais ce n'est qu'en 1935 que Erspamer montre l'existence d'une substance capable de contracter les muscles lisses (Erspamer et Vialli, 1935). En 1946, le groupe de Rapport isole un facteur constrictor à partir du sérum et l'appelle par conséquent sérotonine. L'année suivante, Rapport élucide la structure du facteur comme étant la 5-hydroxytryptamine (Rapport et al., 1947). La sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT) est synthétisée à partir du tryptophane, un acide aminé neutre (figure 9.6). Par la suite, la sérotonine est transformée en molécules inactives par biotransformation, majoritairement par le biais de la MAO A. Cette enzyme produit une désamination oxydative de la chaîne aminée latérale conduisant à la libération d'ammoniac et de 5-hydroxy-indol-acétaldéhyde qui est ensuite oxydé en acide 5-hydroxy-indol-acétique (5-HIAA) que l'on trouve dans l'urine (figure 9.6) (Haverback et coll., 1966). Plusieurs études permettent de spéculer que la sérotonine pourrait aussi être biotransformée par d'autres systèmes enzymatiques. Par exemple, chez des rats traités avec du métyrapone ou du ketoconazole, deux inhibiteurs du cytochrome P450, la concentration de sérotonine dans le cerveau augmente (Leret et coll., 1998). Cette observation nous a mené à émettre l'hypothèse que le cytochrome P450 pouvait contribuer à la biotransformation de la sérotonine.

Figure 9.6

Biosynthèse et biotransformation de la sérotonine (5-HT)

Schéma représentant la biosynthèse de la sérotonine à partir du tryptophane, ainsi que la biotransformation de la sérotonine par la monoamine oxidase A et l'aldéhyde déshydrogénase en 5-Hydroxy-indol-acétique (5-HIAA) (Haverback et coll., 1966).

Figure 9.6
Biosynthèse et biotransformation de la sérotonine (5-HT)



En 1953, Twarog et Page démontrent dans le cerveau des mammifères que la sérotonine est un neurotransmetteur. Dix ans plus tard, Woolley et Gommi (1963) émet l'hypothèse que cette amine joue un rôle important dans la pathophysiologie de certaines maladies mentales. Cette hypothèse sera précisée ensuite, notamment par Coppen en 1969, qui proposa que la sérotonine est impliqué dans la dépression. Les 30 dernières années ont vu une multiplication impressionnante du nombre de travaux expérimentaux et d'observations cliniques démontrant l'impact de la sérotonine non seulement dans la dépression mais aussi dans l'anxiété, la conduite suicidaire, les désordres alimentaires, le trouble obsessionnel compulsif et l'alcoolisme (Gorman, 2003; Pettinati et coll., 2003). En parallèle, il a été aussi montré que la sérotonine exerce un rôle important dans nombre de fonctions physiologiques tels que le sommeil, l'appétit, le rythme cardiaque, la régulation de l'humeur, les fonctions cognitives et le développement du cerveau (Pettinati et coll., 2003; Ursin, 2002; Ramage, 2001; Chiavegatto et coll., 2001; Okado et coll., 2001; Van der Does, 2001). D'autre part, la sérotonine agit sur les systèmes nerveux et vasculaire ainsi que sur la contraction des muscles lisses (de Wadener, 2001; Chandra et Chandra, 1993). Les effets de la sérotonine au niveau du système nerveux central sont nombreux, complexes et encore mal connus mais d'une importance considérable sur le plan pharmacologique car de nombreux médicaments agissent sur les concentrations de la sérotonine dans la synapse.

La connaissance des récepteurs de la sérotonine est en pleine évolution et il est encore difficile de systématiser les effets correspondant à la stimulation des divers types de récepteurs sérotoninergiques. Diverses revues dans la littérature ont été consacrées

aux récepteurs de la sérotonine (Hoyer, 1990; Zifa et Fillion, 1992; Peroutka, 1993, 1994; Hoyer et Martin, 1997). En bref, nous retrouvons deux familles structurales pour les récepteurs de la sérotonine, c'est-à-dire les récepteurs couplés aux protéines G et les récepteurs de type canaux. Quinze types de récepteurs de la sérotonine ont été identifiés à ce jour. Les récepteurs sont classifiés en 7 familles principales, 5-HT₁ à 5-HT₇, selon leur structure et les voies de signalisation activées. Certaines de ces familles contiennent divers sous-types de récepteurs qui ont des structures similaires et qui sont couplés à la même protéine G. La famille des récepteurs 5-HT₁ contient 5 différents récepteurs qui ont de 41 à 63% d'homologie dans leurs séquences d'acides aminés. Ils sont présents dans une bonne variété de tissus et d'espèces, et ils sont généralement couplés à la protéine G_{i/o} afin d'inhiber la formation de cAMP. La famille des récepteurs, 5-HT₂ comprend 3 sous-types ayant de 46 à 50% d'homologie. La distribution et la fonction physiologique des récepteur 5-HT₂ sont peu connues. Ces récepteurs sont habituellement couplés à la protéine G_{q/11} qui produit, entre autres, une augmentation du calcium intracellulaire. Quant à la famille 5-HT₃, les récepteurs qui la composent sont des récepteurs de types canaux. Ils sont exclusivement retrouvés dans les tissus neuronaux où ils produisent une dépolarisation très rapide. Pour ce qui est des familles 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ et 5-HT₇, ils sont tous couplés à la protéine G_s et activent la formation de cAMP. Ils ne font pas partie de la même famille puisqu'ils ont moins de 40% d'homologie entre eux (Martin et coll., 2000).

Les effets cardiovasculaires de la sérotonine sont extrêmement complexes. Ils sont variables selon la dose injectée, selon les conditions expérimentales, selon les espèces et selon l'état du système vasculaire. La sérotonine peut provoquer une

vasoconstriction et aussi une vasodilatation. Six récepteurs à la sérotonine semblent participer à ces effets vasculaires : les récepteurs 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT₄ et 5-HT₇ (Martin et coll., 2000; Ramage, 2001). L'activation des récepteurs 5-HT_{1B} déclenche une contraction artérielle au niveau périphérique. Un intérêt tout particulier des agonistes au 5-HT_{1B} réside dans le fait qu'ils sont responsables de la quasi totalité de l'effet vasoconstricteur sérotonergique sur les vaisseaux périphériques et intracrâniens (Lee et coll., 1998; Ramage, 2001). Le rôle des récepteurs 5-HT_{1D} dans la contraction vasculaire cérébrale et/ou coronarienne est un sujet d'étude en plein développement (Goldstein et coll., 1996; Ramage, 2001). Les récepteurs 5-HT_{2A} contrôlent la contraction des muscles lisses au niveau des systèmes nerveux central et périphérique, et l'agrégation plaquettaire (Pawlak et coll., 1998; Ramage, 2001).

En ce qui concerne la fonction vasorelaxante de la sérotonine, trois types de récepteurs semblent y participer : les récepteurs 5-HT_{2B}, 5-HT₄ et 5-HT₇ (Martin et coll., 2000; Ramage, 2001). Ces récepteurs sont responsables de la relaxation sérotonergique sur des fibres musculaires lisses préalablement contractées (veine fémorale, jugulaire, artère utérine humaine et aussi les muscles lisses intestinaux) (Ramage, 2001). Les mécanismes sous-jacents à la vasorelaxation par la sérotonine ne sont pas très bien compris. L'effet vasorelaxant serait associé à l'action des récepteurs sérotonergiques ainsi qu'à la génération de NO^{*}. Toutefois, le rôle du NO^{*} semble être contesté puisque l'inhibition de la NOS ne bloque pas la relaxation induite par la sérotonine (Tsuru et coll., 1998; Ramage, 2001). Il est à noter que la fonction des récepteurs 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT₄ et 5-HT₇ n'est pas uniquement de

Figure 9.7

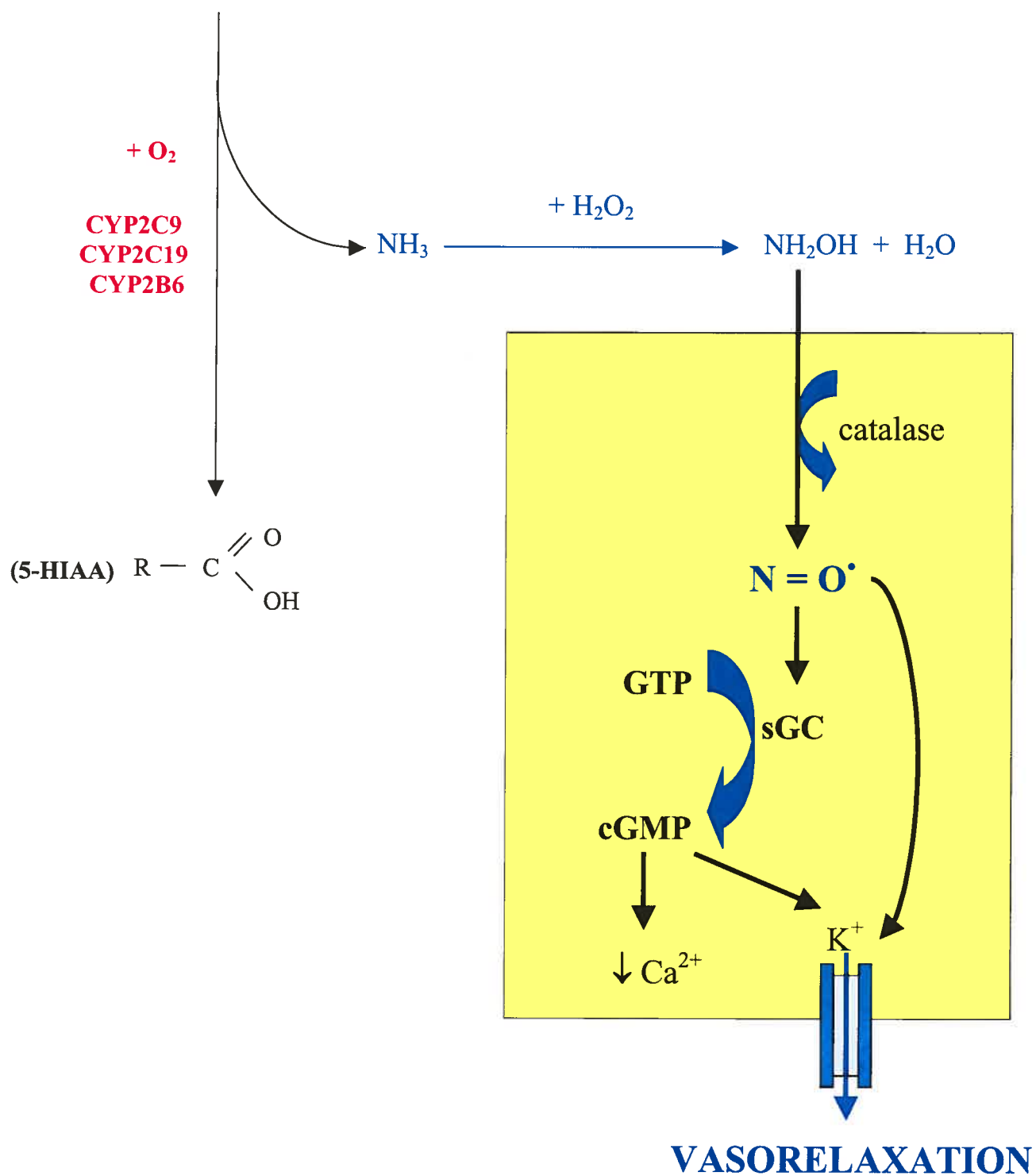
Formation de NO[•] suite à la biotransformation de la sérotonine par les CYP2B6, CYP2C9 et CYP2C19.

Schéma représentant la biotransformation de la sérotonine par les cytochromes P450 en 5-Hydroxy-indol-acétique (5-HIAA) et en hydroxylamine (Fradette et coll., 2003), produit qui génère du NO[•] en présence de catalase (Miller et Trepannier, 2002). Le NO[•] active ensuite la guanylate cyclase. Cette activation provoque la transformation du guanosine triphosphate, GTP, en guanosine mono-phosphate cyclique, GMP cyclique, dont l'augmentation est responsable de la modulation de l'activité de diverses protéine kinases qui provoquent une hyperpolarisation ayant pour conséquence entre autres la relaxation des fibres vasculaires lisses (Brennan et Moncada, 2002).

Figure 9.7

Formation de NO^\bullet suite à la biotransformation de la sérotonine par les CYP2C9, CYP2C19 et CYP2B6

(5-HT) $\text{R} - \text{CH}_2 - \text{NH}_2$



réguler la vasoactivité, ils sont aussi responsables de diverses fonctions physiologiques telles l'agrégation plaquettaire, le rythme cardiaque ainsi que la motilité intestinale. De plus, ces récepteurs sont aussi associés à diverses maladies comme les migraines, les nausées et des maladies affectives comme la dépression (Gorman, 2003; Pettinati et coll., 2003; Ramage, 2001).

De cette revue de la littérature, nous retenons que la sérotonine pourrait être métabolisée par un système enzymatique autre que la MAO et que la sérotonine peut agir comme vasorelaxant via des mécanismes qui sont encore à ce jour plus ou moins bien connus. Nos résultats démontrent que le cytochrome P450 a effectivement la capacité de biotransformer la sérotonine. Spécifiquement, ce sont les cytochromes CYP2C9, CYP2C19 et CYP2B6 qui biotransforment la sérotonine en 5-HIAA et en hydroxylamine, produit qui génère du NO^\bullet en présence de catalase. Le schéma 9.7 résume les différentes étapes de la biotransformation de la sérotonine par les cytochromes P450 conduisant à la formation de NO^\bullet et à la vasorelaxation. Il est intéressant de noter que la capacité des cytochromes P450 à former du NO^\bullet est grandement variable (tableau 9.1).

Tableau 9.1
Cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme de la sérotonine

Enzymes	Biotransformation de la sérotonine	C _{max} * de NO [•] généré (μM)
Monoamine oxydase (MAO)	Oui (environ 80% de la biotransformation totale de sérotonine dans les hépatocytes)	
Hépatocytes + inhibiteur de la MAO	Oui (environ 20% de la biotransformation totale de sérotonine dans les hépatocytes)	
CYP1A2	Non	0
CYP2B6	Oui	1.30 ± 0.10
CYP2C9	Oui	2.04 ± 0.07
CYP2C19	Oui	1.48 ± 0.04
CYP2D6	Non	0
CYP3A4	Non	0

* C_{max} : Concentration maximale de NO[•] produite par une isoforme du cytochrome P450.

Fradette et coll., 2003 (sous presse).

Bien que l'effet vasorelaxant de la sérotonine soit primordialement attribué aux récepteurs sérotoninergiques, il a été suggéré que la sérotonine pourrait relaxer le muscle lisse par des mécanismes indépendants des récepteurs à la sérotonine, mécanismes encore peu caractérisés à ce jour (Emre-Aydingoz et coll., 2001; Emre et coll., 2000). Nos résultats nous permettent de spéculer que la vasorelaxation indépendante des récepteurs sérotonergiques serait causée par la désamination de la sérotonine par le cytochrome P450 ou par la MAO A. Tel que montré sur les figures 9.6 et 9.7, la désamination de la sérotonine par la MAO A génère de l'ammoniac (NH_3), du peroxyde d'hydrogène ainsi que le 5-hydroxy-indol-acétique (5-HIAA) (Hauptmann et coll., 1996). Dans la cellule, en présence de peroxyde d'hydrogène, l'ammoniac est spontanément oxydé en hydroxylamine (NH_2OH) (Nagano et Fridovich, 1985). L'effet vasorelaxant de l'hydroxylamine est bien connu et est en fait associé à sa décomposition en NO^\bullet (Miller et Trepanier, 2002). En effet, une réaction enzymatique catalysée par la catalase génère du NO^\bullet et de l'eau à partir de l'hydroxylamine en présence de peroxyde d'hydrogène (figure 9.7) (Katsuki et coll., 1977).

La biotransformation de la sérotonine par le cytochrome P450 représente environ 20% de sa biotransformation totale dans le foie, et 80% de la biotransformation de la sérotonine est réalisée par la MAO A. Cette différence, 20 vs. 80%, est modifiée en présence d'inducteurs enzymatiques. Nos résultats ayant été obtenus avec des hépatocytes et des enzymes recombinantes soulèvent la question suivante : la biotransformation de la sérotonine par le cytochrome P450 pourrait-elle avoir lieu dans le

système nerveux central ? La littérature appuie cette possibilité. En effet, il a été rapporté que les inhibiteurs du cytochrome P450 donneraient lieu à une réponse antidépressive de par leur capacité à augmenter la concentration de sérotonine dans le cerveau (Murphy, 1997; Healy et coll., 1999). L'augmentation de la sérotonine dans le cerveau serait probablement secondaire à la diminution de son métabolisme par le cytochrome P450. De plus, la phénytoïne, un antiépileptique, augmente aussi la concentration de sérotonine dans le cerveau (Giancarlo et coll., 2001). Pour tenter d'expliquer cette observation, il faut tenir compte que la phénytoïne est métabolisée par les CYP2C9 et 2C19. Nous pouvons donc spéculer que la phénytoïne diminuerait le métabolisme de la sérotonine par inhibition compétitive pour ces cytochromes P450.

Les implications de notre observation, c'est-à-dire que la sérotonine est biotransformée par le cytochrome P450 et que cela génère du NO[•], sont difficiles à prévoir. En plus d'être un puissant vasodilatateur (Brennan et Moncada, 2002), le NO[•] agit comme messenger pour moduler de nombreuses fonctions nerveuses (Prast et Philippu, 2001). Entre autres, il a été démontré que par la synthèse de GMPc et l'activation de ses voies de signalisation, le NO[•] pourrait avoir un rôle dans la dépression et la mémoire (van Amsterdam et Opperhuizen, 1999; Prast et Philippu, 2001). Le NO[•] semble également jouer un rôle dans la modulation du relargage de neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine, les catécholamines, l'histamine et la sérotonine elle-même (Prast et Philippu, 2001). La production de ces neurotransmetteurs peut engendrer une multitude de changements dans le système nerveux central. En tenant compte de l'importance du rôle de la sérotonine et du NO[•] dans le système nerveux central, nous

pouvons spéculer que nos résultats auront un impact sur la compréhension de la physiopathologie du système nerveux central.

Tel que décrit dans le chapitre 5 de cette thèse, ce n'est que depuis à peine vingt ans que le cytochrome P450 est reconnu comme un système enzymatique impliqué dans le métabolisme de substances endogènes. La plus étudiée d'entre elles est certainement l'acide arachidonique. En effet, plusieurs cytochromes P450 sont impliqués dans le métabolisme de l'acide arachidonique; entre autres les membres des sous-familles CYP4A, 4B et 4F sont impliqués dans la formation des HETEs (agents vasoconstricteurs), alors que les sous-familles CYP1A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2J et 4A catalysent la formation des EETs (agents vasodilatateurs) (Roman, 2002).

En plus d'avoir un rôle dans l'homéostasie cardiovasculaire, les CYP2B et CYP2C19 peuvent aussi induire indirectement des actions biologiques puisque les EETs peuvent inciter la libération d'hormones peptidiques, inhiber les canaux Na^+/K^+ -ATPase rénaux (Schwartzman et coll., 1985 ; Schwartzman et McGiff, 1995) et induire l'angiogenèse (Catella et coll., 1990 ; Fitzpatrick et Murphy, 1988). Les produits des CYPs dérivés de l'acide arachidonique jouent aussi un rôle important dans la régulation de la croissance cellulaire. Par ailleurs, l'inhibition des CYP2C9 et CYP2C19 diminue la prolifération des cellules, effet associé à des médiateurs endogènes, encore inconnus, indépendants de l'acide arachidonique, des EETs et des HETEs (Sellmayer et coll., 1991). Nos résultats ajoutent maintenant à ces connaissances que les CYP2B6, CYP2C9 et CYP2C19 du cytochrome P450 sont en plus une source de NO^* .

CONCLUSION

Depuis la découverte du cytochrome P450, de multiples observations sur ses changements d'activité et d'expression ont grandement contribué au progrès de la pharmacologie ainsi qu'au développement de médicaments plus efficaces et moins toxiques. De plus, la recherche réalisée pendant les deux dernières décennies a rapporté de nouvelles données concernant le rôle endogène des enzymes du cytochrome P450 dans l'homéostasie de l'organisme. Ces rapports démontrent que le cytochrome P450 n'a pas qu'une fonction passive en tant qu'enzyme de faible spécificité pour l'élimination générale de xénobiotiques. Bien au contraire, le cytochrome P450 est une superfamille d'enzymes activement impliquée dans la biotransformation de multiples substances endogènes telles les hormones, les acides gras et les amines.

L'activité métabolique du cytochrome P450 est grandement affectée par les divers stimuli engendrés par l'hypoxie, ce qui a comme effet de provoquer des conséquences cliniques et toxicologiques (du Souich et coll., 1978). Les études réalisées dans notre laboratoire sur l'hypoxie ont permis de mettre en évidence plusieurs notions nouvelles sur le contrôle de l'activité et de l'expression, de même que la fonction endogène du cytochrome P450 :

- 1) L'hypoxie affecte différemment les cytochromes P450 puisque cette manifestation pathologique provoque à la fois la répression des CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 et CYP2B6 ainsi que l'induction du CYP3A6;

- 2) Dans notre modèle d'hypoxie les cytokines IL-1 β , IL-2, IFN- γ et l'érythropoïétine sont les médiateurs sériques responsables des changements d'activité et d'expression du cytochrome P450;
- 3) L'amplitude de la réponse aux cytokines dépend de la sensibilité des cellules, c'est-à-dire les hépatocytes provenant de lapins soumis à l'hypoxie répondent plus que ceux de lapins témoins;
- 4) La régulation négative des CYP1A1 et CYP1A2 est précédée par la diminution de leur activité;
- 5) Les facteurs de transcription HIF-1, AP-1 et le récepteur nucléaire CAR sont responsables de l'induction *in vivo* de l'expression du CYP3A6;
- 6) Seulement les facteurs de transcription HIF-1 et AP-1 sont impliqués dans l'induction *in vitro* de l'expression du CYP3A6;
- 7) La sérotonine est biotransformée par les cytochromes CYP2C9, CYP2C19 et CYP2B6; et finalement
- 8) La biotransformation de la sérotonine génère de l'hydroxylamine qui, en présence de catalase, produit du NO $^{\bullet}$.

Tel que décrit précédemment, les projets de recherche effectués dans notre laboratoire pendant ces dernières années ont permis d'élucider l'effet de l'hypoxie sur le cytochrome P450 ainsi qu'un tout nouveau rôle physiologique du cytochrome P450. Ces données nous servent de base pour proposer des futures avenues de recherche.

In vivo, en présence d'hypoxie, les médiateurs sériques de la répression des CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 et CYP2B6 sont l'IL-1 β , l'IL-2 et l'IFN- γ . Les voies de signalisation spécifiquement activées par ces cytokines doivent être caractérisées afin de déterminer le ou les mécanismes d'action responsables de la répression des CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 et CYP2B6 par l'hypoxie. L'effet de l'hypoxie sur les récepteurs nucléaires responsables de la régulation de ces isoformes doit être étudié. Nous avons démontré que l'induction de l'expression et l'activation du facteur de transcription AP-1 par le plomb diminuent l'expression des CYP1A1 et CYP1A2. Puisque dans notre modèle d'hypoxie il se produit aussi une induction et une activation de AP-1, nous pouvons émettre l'hypothèse que AP-1 participe à la diminution de l'expression des CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 et CYP2B6 par l'hypoxie. De plus, de nombreuses voies de signalisation activées par les cytokines ou par les SOR augmentent NF- κ B, ce qui permet d'imaginer que ce facteur de transcription pourrait aussi contribuer à la régulation négative des CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 et CYP2B6 par l'hypoxie. À cette fin, on pourra utiliser des approches capables de discriminer leurs rôles respectifs 1) des essais de retard sur gel pour cibler les facteurs de transcription se liant aux régions de contrôle des gènes des *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19* et *CYP2B6*, et susceptibles d'en moduler l'expression et 2) l'inactivation spécifique des kinases, des facteurs de transcription, ainsi que des SOR afin de caractériser les voies de signalisation activées par les cytokines.

L'hypoxie diminue l'activité et l'expression des CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9 et CYP2C19 tout en augmentant parallèlement l'expression du CYP3A6. Mais

à quelle fin se réalisent ces changements ? Lors de l'hypoxie, il se produit une baisse d'albumine et une augmentation des protéines de la phase aigüe (Wenger et coll., 1995), ce qui permet de supposer que les changements d'expression des cytochromes P450 se réalisent afin de moduler l'expression de l'albumine et autres protéines. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la diminution de l'expression de certains cytochromes P450 se produit afin de sauvegarder de l'énergie ou encore, pour diminuer la production de substances indésirables en présence d'hypoxie, par exemple la production de substances ayant un effet de vasoconstriction. Pour ce qui est de l'induction du CYP3A6, nous pourrions spéculer que l'augmentation de l'expression de cette enzyme a pour conséquence de produire une substance utile à la protection de l'organisme lors de l'hypoxie. Puisque l'augmentation de l'expression du CYP3A6 lors de l'hypoxie est régulée, entre autres, par le HIF-1, nous pouvons émettre comme hypothèse que le CYP3A6 est impliqué dans la modulation de l'expression de gènes induits par le HIF-1 afin d'augmenter la distribution du sang et le métabolisme cellulaire. L'utilisation d'animaux transgéniques, knockout et exprimant de façon constitutive un taux élevé et constant de l'isoforme CYP3A6 du cytochrome P450 pourrait aider à élucider les avantages et les inconvénients de sa modulation lors de l'hypoxie.

Nous avons démontré que les isoformes CYP2B6, CYP2C9 et CYP2C19 participent à la génération de NO^\bullet à partir de la sérotonine. Tel que décrit précédemment, la sérotonine et le NO^\bullet contribuent à de multiples fonctions et effets dans le système nerveux central. Maintenant, il faut étudier la contribution, de même que le rôle, des cytochromes P450 dans la biotransformation de la sérotonine au niveau du système

nerveux central. Chez l'homme, le polymorphisme génétique de l'expression des CYP2C9 et CYP2C19 devrait influencer la vitesse de biotransformation de la sérotonine. De plus, l'induction ou l'inhibition des cytochromes P450 cérébral vont moduler les concentrations de sérotonine et de NO[•]. Il pourrait se révéler cliniquement important de déterminer l'influence du polymorphisme génétique, ainsi que de l'induction et de l'inhibition enzymatique sur l'incidence des maladies affectives et sur les résultats de leur traitement.

Les avantages et les inconvénients que la modulation du cytochrome P450 apportent à l'organisme doivent être étudiées avant d'élaborer et d'appliquer des stratégies thérapeutiques. Si l'organisme tire des avantages de la modulation du cytochrome P450, contrer cette modulation pourrait créer des problèmes de santé chez les patients. En conséquence, il apparaît primordial d'élucider non seulement les situations qui entraînent une régulation du cytochrome P450 dans le but de mieux utiliser les médicaments, mais aussi de comprendre pourquoi ces enzymes sont régulées par les pathologies.

RÉFÉRENCES

- ABDEL-RAZZAK, Z., LOYER, P., FAUTREL, A., GAUTIER, J.C., CORCOS, L., TURLIN, B., BEAUNE, P. & GUILLOUZO, A. (1993) Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol. Pharmacol.* 44, 707-715.
- AGANI, F. & SEMENZA, G.L. (1998). Mersalyl is a novel vascular endothelial growth factor gene expression and hypoxia-inducible factor 1 activity. *Mol. Pharm.* 54, 749-754.
- AGNIHOTRI, S.N., CLARK, R.A., COOPER, S., LYUN, A.O. et TUCKER, G.T. (1978) Chronic pulmonary disease and antipyrine disposition. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 5(3), 275-277.
- ALTHAUS, J.S., ANDRUS, P.K., WILLIAMS, C.M., VONVOIGTLANDER, P.F., CAZERS, A.R. et HALL, E.D. (1993) The use of salicylate hydroxylation to detect hydroxyl radical generation in ischemic and traumatic brain injury. Reversal by tirilazad mesylate (U-74006F). *Mol. Chem. Neuropathol.* 20(2), 147-162.
- ANGUS, P.W., MORGAN, D.J. et SMALLWOOD, R.A. (1990) Review article: hypoxia and hepatic drug metabolism--clinical implications. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 4(3), 213-225.
- AUGÉ, N., NÈGRE-SALVAYRE, A., SALVAYRE, R. et LEVADE, T. (2000) Sphingomyelin metabolites in vascular cell signaling and atherogenesis. *Progress in Lipid Research.* 39, 207-229.

- AURON, P.E. (1998) The interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9(3-4), 221-237.
- AXELROD, J. (1955) The enzymatic demethylation of ephedrine. *J. Pharmacol.* 144, 430-438.
- BACKLUND, M., JOHANSSON, I., MKRTCHIAN, S. et INGELMAN-SUNDBERG, M. (1997) Signal transduction-mediated activation of the aryl hydrocarbon receptor in rat hepatoma H4IIE cells. *J. Biol. Chem.* 272(50), 31755-31763.
- BARAKAT, M. et DU SOUICH, P. (1996) Effect of nifedipine on the elimination of theophylline in the rabbit subjected to hypoxia or to an inflammatory reaction. *J. Pharm. Pharmacol.* 48(9), 906-910.
- BAROUKI, R. et MOREL, Y. (2001) Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochem. Pharmacol.* 61(5), 511-516.
- BARRY, M. et FEELY, J. (1990) Enzyme induction and inhibition. *Pharmacol. Ther.* 48(1), 71-94.
- BATT, A.M., STRAZIELLE, N. et SIEGST, G. (1993) Induction and repression of cytochromes P450. In vivo and in vitro approach. *Thérapie.* 48(6), 527-536.
- BAUD, V. et KARIN, M. (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell. Biol.* 11(9), 372-377.
- BEAUNE, P. (1993) Les cytochrome P450 humains. *Thérapie.* 48, 521-526.

- BECHTEL, P., DELAFIN, C. et BECHTEL, Y. (1975) Effect of chronic hypoxia ($FiO_2 = 0.06 - FiO_2 = 0.08$) on mouse liver cytochrome P450 and b5 content. C. R. Seances. Soc. Biol. Fil. 169(5), 1295-1302.
- BELLO, I., PEREZ, A., TORRES, A.M., HERNANDEZ, M.V. & LOPEZ SAURA, P. (1998) High levels of soluble IFN gamma receptor alpha chain in the plasma of rheumatoid arthritis patients. Biotherapy 11, 53-57.
- BENYO, D.F., MILES, T.M. et CONRAD, K.P. (1997) Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta. J. Clin. Endocrinol. Metab. 82(5), 1582-1588.
- BERNA, N., ARNOULD, T., REMACLE, J. & MICHIELS, C. (2001). Hypoxia-induced increase in intracellular calcium concentration in endothelial cells: role of the Na(+)-glucose cotransporter. J. Cell. Biochem. 84, 115-131.
- BERNHARDT, R. (1996) Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 127:137-221.
- BERTRAM, B., SCHUHMACHER, J., FREI, E., FRANK, N. et WIESSLER, M. (1982) Effects of disulfiram on mixed function oxidase system and trace element concentration in the liver of rats. Biochem. Pharmacol. 31(22), 3613-3619.
- BIANCHI, L., TACCHINI, L. et CAIRO, G. (1999) HIF-1-mediated activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation. Nucleic Acids Res. 27, 4223-4227.
- BLAZQUEZ, C., WOODS, A., DE CEBALLOS, M.L., CARLING, D. & GUZMAN, M. (1999) The AMP-activated protein kinase is involved in the regulation of ketone body production by astrocytes. J. Neurochem. 73, 1674-1682.

- BLEAU, A.M., MAUREL, P., PICHETTE, V., LEBLOND, F. et DU SOUICH, P. (2003) Interleukin-1, interleukin-6, tumour necrosis factor- and interferon- released by a viral infection and an aseptic inflammation reduce CYP1A1, 1A2 and 3A6 expression in rabbit hepatocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 473(2-3), 197-206.
- BLEAU, A.M., FRADETTE, C., EL-KADI, A.O., COTE, M.C. ET DU SOUICH, P. (2001) Cytochrome P450 down-regulation by serum from humans with a viral infection and from rabbits with an inflammatory reaction. *Drug Metab. Dispos.* 29(7), 1007-1012.
- BLEAU, A.M., LEVITCHI, M., MAURICE, H. & DU SOUICH, P. (2000) Different cytokines mediate in vivo the human viral- and the rabbit turpentine-induced inflammation inactivation of hepatic cytochrome P450. *Br. J. Pharmacol.* 130, 1777-1784.
- BLOKHINA, O., VIROLAINEN, E. et FAGERSTED, K.V. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot. (Lond)*. 91 Spec No:179-194.
- BONKOVSKY, H.L., LINCOLN, B., HEALEY, J.F., OU, L.C., SINCLAIR, P.R. et MULLER-EBERHARD, U. (1986) Hepatic heme and drug metabolism in rats with chronic mountain sickness. *Am. J. Physiol.* 251(4 Pt 1), G467-G474.
- BORSEN, K., SKJELBO, E., RASMUSSEN, B.B., POULSEN, H.E. et LOFT, S. (1993) Fluvoxamine is a potent inhibitor of cytochrome P4501A2. *Biochem. Pharmacol.* 45(6), 1211-1214.
- BOUCHER, J.L. et al. (1992) Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of N omega-hydroxy-L-arginine by NADPH and O₂ to nitric oxide and citrulline. *Biochem Biophys Res Commun* 187, 880-886.

- BRADY, J.F., ISHIZAKI, H., FUKUTO, J.M., LIN, M.C., FADEL, A., GAPAC, J.M., YANG, C.S. (1991) Inhibition of cytochrome P-450 2E1 by diallyl sulfide and its metabolites. *Chem. Res. Toxicol.* 4(6), 642-647.
- BRASS, C.A., CRAWFORD, J.M., NARCISO, J. & GOLLAN, J.L. (1992) Hypoxic liver injury and the ameliorating effects of fructose: the "glucose paradox" revisited. *Am. J. Physiol.* 263, G293-300.
- BRASS, C.A., NARCISCO, J. et GOLLAN, J.L. (1991) Enhanced activity of the free radical producing enzyme xanthine oxidase in hypoxic rat liver. Regulation and pathophysiologic significance. *J. Clin. Invest.* 87(2), 424-431.
- BRAUGHLER, J.M. et PREGENZER, J.F. (1989) The 21-aminosteroid inhibitors of lipid peroxidation: reactions with lipid peroxyl and phenoxy radicals. *Free Radic. Biol. Med.* 7(2), 125-130.
- BRAUGHLER, J.M., PREGENZER, J.F., CHASE, R.L., DUCAN, L.A., JACOBSEN, E.J. et MCCALL, J.M. (1987) Novel 21-amino steroids as potent inhibitors of iron-dependent lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 262(22), 10438-10440.
- BRENNAN, P.A. et MONCADA, S. (2002) From pollutant gas to biological messenger: the diverse actions of nitric oxide in cancer. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 84(2), 75-78.
- BRESSLER, J., KIM, K.A., CHAKRABORTI, T. & GOLDSTEIN, G. (1999). Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. *Neurochem. Res.* 24, 595-600.
- BRODIE, B.B., AXELROD, J., COOPER, J.R., GAUDETTE, L., LADU, B.N., MITOMA, C. et UNDEFRIEND, S. (1955) Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver microsomes. *Science.* 121, 603-604.

- BROSEN, K. (1995) Drug interactions and the cytochrome P450 system. The role of cytochrome P450 1A2. *Clin. Pharmacokinet.* 29 Suppl 1, 20-25.
- BROWN, S.E., QUATTROCHI, L.C. & GUZELIAN, P.S. (1997) Characterization of a pretranscriptional pathway for induction by phenobarbital of cytochrome P450 3A23 in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 342, 134-142.
- BRUNING, T.A., CHANG, P.C., BLAUW, G.J., VERMEIJ, P. et VAN ZWIETEN PA. (1993) Serotonin-induced vasodilatation in the human forearm is mediated by the "nitric oxide-pathway": no evidence for involvement of the 5-HT₃-receptor. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22, 44-51.
- BUNN, H.F., GU, J., HUANG, L.E., PARK, J.W. & ZHU, H. (1998) Erythropoietin: a model system for studying oxygen-dependent gene regulation. *J. Exp. Biol.* 201, 1197-1201.
- BUNN, H.F. & POYTON, R.O. (1996) Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol. Rev.* 76, 839-885.
- BURNS, K., CLATWORTHY, J., MARTIN, L., MARTINON, F., PLUMPTON, C., MASCHERA, B., LEWIS, A., RAY, K., TSCHOPP, J. et VOLPE, F. (2000) Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat. Cell. Biol.* 2(6), 346-351.
- CALLEJA, C., EECKHOUTTE, C., DACASTO, M., LARRIEU, G., DUPUY, J., PINEAU, T. & GALTIER, P. (1998) Comparative effects of cytokines on constitutive and inducible expression of the gene encoding for the cytochrome P450 3A6 isoenzyme in cultures rabbit hepatocytes: consequences on progesterone 6beta-hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.* 56, 1279-1285.

- CALLEJA, C., EECKHOUTTE, C., LARRIEU, G., DUPUY, J., PINEAU, T. & GALTIER, P. (1997) Differential effects of interleukin-1 beta, interleukin-2, and interferon-gamma on the inducible expression of CYP1A1 and 1A2 in cultured rabbit hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 273-278.
- CAPDEVILA, J.H., FALCK, J.R. et ESTABROOK, R.W. (1992) Cytochrome P450 and the arachidonate cascade. *FASEB J.* 6(2), 731-736.
- CAPDEVILA, J., CHOCOS, N., WERRINGLOER, J., PROUGH, R.A. et ESTABROOK, R.W. (1981) Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5362-5366.
- CARBALLO, M., CONDE, M., EL BEKAY, R., MARTIN-NIETO, J., CAMACHO, M.J., MONTESEIRIN, J., CONDE, J., BEDOYA, F.J. et SOBRINO, F. (1999) Oxidative stress triggers STAT3 tyrosine phosphorylation and nuclear translocation in human lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 274(25), 17580-17586.
- CARLSON, T.J. et BILLINGS, R.E. (1996) Role of nitric oxide in the cytokine-mediated regulation of cytochrome P-450. *Mol. Pharmacol.* 49(5), 796-801.
- CATELLA, F., LAWSON, J.A., FITZGERALD, D.J. et FITZGERALD, G.A. (1990) Endogenous biosynthesis of arachidonic acid epoxides in humans: increased formation in pregnancy-induced hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87(15), 5893-5897.
- CELLEK, S., KASAKOV, L. et MONCADA S. (1996) Inhibition of nitrenergic relaxations by a selective inhibitor of the soluble guanylate cyclase. *Br. J. Pharmacol.* 118, 137-140.

- CHADWICK, D., GORROD, J.W., JENNER, P., MARSDEN, C.D. et REYNOLDS, E.H. (1978) Functional changes in cerebral 5-hydroxytryptamine metabolism in the mouse induced by anticonvulsant drugs. *Br. J. Pharmacol.* 62, 115-124.
- CHAN, W.K., YAO, G., GU, Y.Z. & BRADFIELD, C.A. (1999). Cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways. Demonstration of competition and compensation. *J. Biol. Chem.* 274, 12115-12123.
- CHANDEL, N.S., MALTEPE, E., GOLDWASSER, E., MATHIEU, C.E., SIMON, M.C. & SCHUMACKER, P.T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 5015-5019.
- CHANDRA, M. et CHANDRA, N. (1993) Serotonergic mechanisms in hypertension. *Int. J. Cardiol.* 42(3), 189-196.
- CHAURET, N., TREMBLAY, N., LACKMAN, R.L., GAUTHIER, J.Y., SILVA, J.S., MAROIS, J., YERGEY J.A., & NICOLL-GRIFFITH, D.A., (1999), Description of a 96-well plate assay to measure P4503A inhibition in human liver microsomes using a selective fluorescent probe. *Analytic. Biochemistry*, 276, 215-225.
- CHIAVEGATTO, S., DAWSON, V.L., MAMOUNAS, L.A., KOLIATSOS, V.E., DAWSON, T.M. et NELSON, R.L. (2001) Brain serotonin dysfunction accounts for aggression in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98(3), 1277-1281.
- COPPEN, A. (1969) Defects in monoamine metabolism and their possible importance in the pathogenesis of depressive syndromes. *Psychiatr. Neurol. Neurochir.* 72(2), 173-180.

- CRAVEN, P.A., DERUBERTIS, R.F. et PRATT, W.D. (1979) Electron spin resonance study of the role of NO • catalase in the activation of guanylate cyclase by NaN₃ and NH₂OH. Modulation of enzyme responses by heme proteins and their nitrosyl derivatives. *J. Biol. Chem.* 254, 8213-8222.
- DALET, C., CLAIR, P., DAUJAT, M., FORT, P., BLANCHARD, J.M. & MAUREL, P. (1988) Complete sequence of cytochrome P450 3c cDNA and presence of two mRNA species with 3' untranslated regions of different length. *DNA* 7:39-46.
- DAMERT, A., IKEDA, E. & RISAU, W. (1997). Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible factor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells. *Biochem. J.* 327, 419-423.
- D'ANDREA, G. (1999) Nitric oxide pathway, Ca²⁺ and serotonin. *Cephalalgia* 19, 767.
- D'ANGIO, C.T. et FINKELSTEIN, J.N. (2000) Oxygen regulation of gene expression: a study in opposites. *Mol. Genet. Metab.* 71(1-2), 371-380.
- DAUJAT, M., CLAIR, P., ASTIER, C., FABRE, I., PINEAU, T., YERLE, M., GELLIN, J., et MAUREL, P. (1991) Induction, regulation and messenger half-life of cytochromes P450 IA1, IA2 and IIIA6 in primary cultures of rabbit hepatocytes. CYP 1A1, 1A2 and 3A6 chromosome location in the rabbit and evidence that post-transcriptional control of gene IA2 does not involve mRNA stabilization. *Eur. J. Biochem.* 200(2), 501-510.
- DE GROOT, H., LITTAUER, A., HUGO-WISSEMAN, D., WISSEMAN, P. et NOLL, T. (1988) Lipid peroxidation and cell viability in isolated hepatocytes in a redesigned oxystat system: evaluation of the hypothesis that lipid peroxidation, preferentially induced at low oxygen partial pressures, is decisive for CCl₄ liver cell injury. *Arch. Biochem. Biophys.* 264(2), 591-599.

- DE WADENER, H.E. (2001) The hypothalamus and hypertension. *Physiol. Rev.* 81(4), 1599-1658.
- DE WAZIERS, I., CUGNENC, P.H., YANG, C.S., LEROUX, J.P. et BEAUNE, P.H. (1990) Cytochrome P 450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253(1), 387-394.
- DEL PILAR FERNANDEZ RODRIGUEZ, M., BELMONTE, A., MEIZOSO, M.J., GARCIA-NOVIO, M. et GARCIA-IGLESIAS, E. (1997) Effect of tirilazad on brain nitric oxide synthase activity during cerebral ischemia in rats. *Pharmacology.* 54(2), 108-112.
- DEL ZOPPO, G., GINIS, I., HALLENBECK, J.M., IADECOLA, C., WANG, X. et FEUERSTEIN, G.Z. (2000) Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol.* 10(1), 95-112.
- DEMASTER, E.G., RAIJ, L., ARCHER, S.L. et WEIR, E.K. (1989) Hydroxylamine is a vasorelaxant and a possible intermediate in the oxidative conversion of L-arginine to nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 527-533.
- DI DONATO, J.A., HAYAKAWA, M., ROTHWARF, D.M., ZANDI, E. et KARIN, M. (1997) A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature.* 388, 548-554.
- DOGRA, S.C., WHITELAW, M.L. et MAY, B.K. (1998) Transcriptional activation of cytochrome P450 genes by different classes of chemical inducers. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 25(1), 1-9.

- DU SOUICH, P., HARTEMANN, D. et SAUNIER, C. (1990) Effect of acute and chronic moderate hypoxia on diltiazem kinetics and metabolism in the dog. *Pharmacology*. 47(6), 378-385.
- DU SOUICH, P., HOEN, B., SAUNIER, C., HARTEMANN, D., SAUTEGEAU, A., COMETTE, A., DELORME, N., POLU, J.M. et SADOUL, P. (1989) Theophylline disposition in patients with COLD with and without hypoxemia. *Chest*. 95(5), 1028-1032.
- DU SOUICH, P. et COURTEAU, H. (1984) Influence of hypercapnia and (or) hypoxemia and metabolic acidosis on sulfamethazine kinetics in the conscious rabbit. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 62(9), 1170-1177.
- DU SOUICH, P., MCLEAN, A.J., LALKA, D., ERILL, S. et GIBALDI, M. (1978) Pulmonary disease and drug kinetics. *Clin. Pharmacokinet.* 3(4), 257-266.
- DURNAS, C., LOI, C.M. et CUSACK, B.J. (1990) Hepatic drug metabolism and aging. *Clin. Pharmacokinet.* 19(5), 359-389.
- DUYNDAM, M.C., HULSCHER, S.T., VAN DER WALL, E., PINEDO, H.M. et BOVEN, E. (2003) Evidence for a role of p38 kinase in hypoxia-inducible factor 1-independent induction of vascular endothelial growth factor expression by sodium arsenite. *J. Biol. Chem.* 278(9), 6885-6895.
- EGUCHI, H., IKUTA, T., TACHIBANA, T., YONEDA, Y. et KAWAJIRI, K. (1997) A nuclear localization signal of human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/hypoxia-inducible factor 1beta is a novel bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. *J. Biol. Chem.* 272(28), 17640-17647.

- ELIASSON, E., MKRTCHIAN, S., HALLPERT, J.R. et INGELMAN-SUNDBERG, M. (1994) Substrate-regulated, cAMP-dependent phosphorylation, denaturation, and degradation of glucocorticoid-inducible rat liver cytochrome P450 3A1. *J. Biol. Chem.* 269(28), 18378-18383.
- EL-KADI, A.O., BLEAU, A.M., DUMONT, I. MAURICE, H. et DU SOUICH, P. (2000) Role of reactive oxygen intermediates in the decrease of hepatic cytochrome P450 activity by serum of humans and rabbits with an acute inflammatory reaction. *Drug Metab. Dispos.* 28(9), 1112-1120.
- EL-KADI, A.O.S., MAURICE, H., ONG, H. & DU SOUICH, P. (1997) Down regulation of the hepatic cytochrome P450 by an acute inflammatory reaction: implication of human and animal serum, and intrahepatic mediators. *Br. J. Pharmacol.* 121, 1164-1170.
- EL-SANKARY, W., PLANT, N.J., GIBSON, G.G. & MOORE, D.J. (2000) Regulation of the CYP3A4 gene by hydrocortisone and xenobiotics: role of the glucocorticoid and pregnane X receptors. *Drug. Metab. Dispos.* 28, 493-496.
- EMRE, S., ERDEM, S.R. et TUNCER, M. (2000) Does serotonin relax the rat anococcygeus muscle via 5-HT7 receptors? *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 362(2), 96-100.
- EMRE-AYDINGOZ, S., ERDEM, S.R. et TUNCER, M. (2001) Relaxation induced by serotonin and sumatriptan in isolated guinea pig gallbladder strips. *Res. Exp. Med. (Berl.)*. 200(3), 175-182.
- ERSPAMER, V. et VIALLI, M. (1935) *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 19, 273.

- FABIAN, R.H., DEWITT, D.S. et KENT, T.A. (1998) The 21-aminosteroid U-74389G reduces cerebral superoxide anion concentration following fluid percussion injury of the brain. *J. Neurotrauma*. 15(6), 433-440.
- FANDREY, J., FREDE, S. & JELKMANN, W. (1994). Role of hydrogen peroxide in hypoxia-induced erythropoietin production. *Biochem. J.* 303, 507-510.
- FEIERMAN, D.E. et CEDERBAUM, A.I. (1987) Increased sensitivity of the microsomal oxidation of ethanol to inhibition by pyrazole and 4-methylpyrazole after chronic ethanol treatment. *Biochem. Pharmacol.* 36(19), 3277-3283.
- FERNANDES, D., DA SILVA-SANTOS, J.E. et ASSREUY, J. (2002) Nitric oxide-induced inhibition of mouse paw edema: involvement of soluble guanylate cyclase and potassium channels. *Inflamm. Res.* 51(8), 377-384.
- FERNANDEZ-RODRIGUEZ, C.M., PRIETO, J., OUROGA, J., ZOZAVA, J.M., ANDRADE, A. et RODRIGUEZ-ORTIGOSA, C. (1997) Enhanced urinary excretion of cGMP in liver cirrhosis. Relationship to hemodynamic changes, neurohormonal activation, and urinary sodium excretion. *Dig. Dis. Sci.* 42(7), 1416-1420.
- FICI, G.J., ALTHAUS, J.S. et VONVOIGTLANDER, P.F. (1997) Effects of lazarooids and a peroxynitrite scavenger in a cell model of peroxynitrite toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 22(1-2), 223-228
- FINKEL, T. (2000) Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* 476(1-2), 52-54.
- FISSELTHALER, B. et al. (1999) Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* 401, 493-497.

- FITZPATRICK, F.A. et MURPHY, R.C. (1988) Cytochrome P-450 metabolism of arachidonic acid: formation and biological actions of "epoxygenase"-derived eicosanoids. *Pharmacol. Rev.* 40(4), 229-241.
- FOLK, J.E. et CHUNG, S.I. (1985) Transglutaminases. *Methods Enzymol.* 113, 358-375.
- FRADETTE, C., YAMAGUCHI, N. et DU SOUICH, P. (2003) Serotonin is biotransformed by CYP2C9, 2C19 and 2B6 to hydroxylamine which is converted into nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* (article sous presse).
- FRADETTE, C. et DU SOUICH, P. (2003) Hypoxia inducible factor-1 and activator protein-1 modulate the up-regulation of CYP3A6 induced by hypoxia. *Br. J. Pharmacol.* 140(6), 1146-1154.
- FRADETTE, C., BLEAU, A.M., PICHETTE, V., CHAURET, N. & DU SOUICH, P. (2002). Hypoxia changes the expression of CYP1A1/1A2 and 3A6 by a mechanism involving the release of serum mediators. *Br. J. Pharmacol.* 137, 881-891.
- FRAZIER, L.W. et YORIO, T. (1992) Eicosanoids: their function in renal epithelia ion transport. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 201(3), 229-243.
- FRIEDBERG, T., WAXMAN, D.J., ATCHISON, M., KUMAR, A., HAAPARANTA, T., RAPHAEL, C. et ADESNIK, M. (1986) Isolation and characterization of cDNA clones for cytochromes P-450 immunochemically related to rat hepatic P-450 form PB-1. *Biochemistry.* 25(24), 7975-7983.
- FUJII-KURIYAMA, Y., MIZUKAMI, Y., TANIGUCHI, T. et MURAMATSU, M. (1982) Molecular cloning and coding nucleotide sequence of complementary DNA of cytochrome P-450 involved in metabolic activation of carcinogenic substances. *Princess. Takamatsu. Symp.* 12, 31-40.

- GAFFEN, S.L., LAI, S.Y., LONGMORE, G.D., LIU, K.D. & GOLDSMITH, M.A. (1999) Genetic evidence for an additional factor required for erythropoietin-induced signal transduction. *Blood* 94, 74-86.
- GALAL, A. et DU SOUICH, P. (1999) 21-aminosteroids prevent the down-regulation of hepatic cytochrome P450 induced by hypoxia and inflammation in conscious rabbits. *Br. J. Pharmacol.* 128(2), 374-379.
- GALEA, E. et FEINSTEN, D.L. (1999) Regulation of the expression of the inflammatory nitric oxide synthase (NOS2) by cyclic AMP. *FASEB J.* 13(15), 2125-2137.
- GARFINKEL. (1958) Studies on pig liver micorsomes. I. Enzymatic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Biochem. Biophys.* 77, 493-509.
- GASCON-BARRE, M., DEMERS, C., GHRAB, O. THEODOROPOULOS, C., LAPOINTE, R., JONES, G., VALIQUETTE, L. et MENARD, D. (2001) Expression of CYP27A, a gene encoding a vitamin D-25 hydroxylase in human liver and kidney. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 54(1), 107-115.
- GERVASINI, G., MARTINEZ, C., AGUNDEZ, J.A., GARCIA-GAMITO, F.J. et BENITEZ, J. (2001) Inhibition of cytochrome P450 2C9 activity in vitro by 5-hydroxytryptamine and adrenaline. *Pharmacogenetics* 11, 29-37.
- GESS, B., SCHRICKER, K., PFEIFER, M. & KURTZ, A. (1997) Acute hypoxia upregulates NOS gene expression in rats. *Am. J. Physiol.* 273, R905-R910.
- GHEZZI, P., DINARELLO, C.A., BIANCHI, M., ROSANDICH, M.E., REPINE, J.E. et WHITE, C.W. (1991) Hypoxia increases production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human mononuclear cells. *Cytokine*. 3, 189-194.

- GIANCARLO, G.M., VENKATAKRISHNAN, K., GRANDA, B.W., VON MOLTKE, L.L. et GREENBLATT, D.J. (2001) Relative contributions of CYP2C9 and 2C19 to phenytoin 4-hydroxylation in vitro: inhibition by sulfaphenazole, omeprazole, and ticlopidine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 57(1), 31-36.
- GIATROMANOLAKI, A., SIVRIDIS, E., MALTEZOS, E., PAPAZOGLU, D., SIMOPOULOS, C., GATTER K.C., HARRIS, A.L. et KOUKOURAKIS, M.I. (2003) Hypoxia inducible factor 1alpha and 2alpha overexpression in inflammatory bowel disease. *J. Clin. Pathol.* 56(3), 209-213.
- GIBSON, G.G., PLANT, N.J., SWALES, K.E., AYRTON, A. & EL-SANKARY, W. (2002). Receptor-dependent transcriptional activation of cytochrome P4503A genes: induction mechanisms, species differences and interindividual variation in man. *Xenobiotica* 32, 165-206.
- GILLUM, J.G., ISRAEL, D.S. et POLK, R.E. (1993) Pharmacokinetic drug interactions with antimicrobial agents. *Clin. Pharmacokinet.* 25(6), 450-82.
- GLUSA, E. et PERTZ, H.H. (2000) Further evidence that 5-HT-induced relaxation of pig pulmonary artery is mediated by endothelial 5-HT(2B) receptors. *Br. J. Pharmacol.* 130, 692-698.
- GOEBELER, M., ROTH, J., BROCKER, E.B., SORG, C. et SCHULZE-OSTHOFF, K. (1995) Activation of nuclear factor-kappa B and gene expression in human endothelial cells by the common haptens nickel and cobalt. *J. Immunol.* 155(5), 2459-2467.
- GOLDBERG, M.A. & SCHNEIDER, T.J. (1994). Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 269, 4355-4359.

- GOLDBERG, M.A., DUNNING, S.P. & BUNN, H.F. (1988). Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein *Science* 242, 1412-1415.
- GOLDSTEIN, J.A. (2001). Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 52(4), 349-355.
- GOLDSTEIN, J., DAHLOF, C.G., DIENER, H.C., OLESEN, J., SCHELLENS, R., SENARD, J.M., SIMARD, D. et STEINER, T.J. (1996) Alniditan in the acute treatment of migraine attacks: a subcutaneous dose-finding study. Subcutaneous Alniditan Study Group. *Cephalalgia*. 16(7), 497-502.
- GONZALEZ, F.J. et LEE, Y.H. (1996) Constitutive expression of hepatic cytochrome P450 genes. *FASEB J.* 10(10), 1112-1117.
- GONZALEZ, F.J. (1992) Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends Pharmacol. Sci.* 13(9), 346-352.
- GONZALEZ, F.J. et NEBERT, D.W. (1990) Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant 'warfare', molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet.* 6(6), 182-186.
- GORMAN, J.M. (2003) New molecular targets for antianxiety interventions. *J. Clin. Psychiatry*. 64 Suppl 3, 28-35.
- GOTHIÉ, E. et POUYSSÉGUR, J. (2002) HIF-1 : régulateur central de l'hypoxie. *Médecine Sciences* 18, 70-78.
- GOZAL, E., SIMAKAJORNBOON, N., DAUSMAN, J.D., XUE, Y.D., CORTI, M., EL-DAHR, S.S. et GOZAL, D. (1999) Hypoxia induces selective SAPK/JNK-2-AP-1

pathway activation in the nucleus tractus solitarii of the conscious rat. *J. Neurochem.* 73(2), 665-674.

GRANT, M.H., RODGERS, E.H., ANDERSON, K., HAYDON, G.H. et HAYES, P.C. (2001) The effect of serum from liver cancer patients on the growth and function of primary and immortalised hepatocytes. *Int. J. Artif. Organs.* 24(11), 807-813

GREENBLATT, D.J., DIVOLL, M., ABERNETHY, D.R. et SHADER, R.I. (1982) Physiologic changes in old age: relation to altered drug disposition. *J. Am. Geriatr. Soc.* 30(11 Suppl), S6-S10.

GREENFEDER, S.A., NUNES, P., KWEE, L., LABOW, M., CHIZZONITE, R.A. & JU, G. (1995) Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J. Biol. Chem.* 270, 13757-13765.

GREK, O.P., SHARAPOV, V.I. et GREK, O.O. (2001) Effect of hypoxic stress on xenobiotic metabolism and activities of various isoforms of cytochrome P-450. *Clin. Pharmacol.* 64(4), 42-44.

GRISHAM, M.B., JOHNSON, G.G. et LANCASTER JR JR. (1996) Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol.* 268, 237-246.

GRUTTER, C.A. et al. (1979) Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 5, 211-224.

GUENGERICH, F.P. (1992) Cytochrome P450: advances and prospects. *FASEB J.* 6(2), 667-668.

GUENGERICH, F.P. (1992) Human cytochrome P-450 enzymes. *Life Sci.* 50(20), 1471-1478.

- GUENGERICH, F.P. et SHIMADA, T. (1991) Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 4(4), 391-407.
- GUENGERICH, F.P., KIM, D.H. et IWASAKI, M. (1991) Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem. Res. Toxicol.* 4(2), 168-179.
- GUEVIN, C., MICHAUD, J., NAUD, J., LEBLOND, F.A. et PICHETTE, V. (2002) Down-regulation of hepatic cytochrome p450 in chronic renal failure: role of uremic mediators. *Br. J. Pharmacol.* 137(7), 1039-1046.
- HADDAD, J.J. (2002) Recombinant TNF-alpha mediated regulation of the I kappa B-alpha/NF-kappa B signaling pathway: evidence for the enhancement of pro- and anti-inflammatory cytokines in alveolar epithelial cells. *Cytokine.* 17(6), 301-310.
- HALAZONETIS, T.D., GEORGOPOULOS, K., GREENBERG, M.E. & LEDER, P. (1988). c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* 55, 917-924.
- HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LOLIGER, J. et ARUOMA O.I. (1995) The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* 33(7), 601-617.
- HAMPL, V., CORNFIELD D.N., COWAN, N.J. & ARCHER, S.L. (1995). Hypoxia potentiates nitric oxide synthesis and transiently increases cytosolic calcium levels in pulmonary artery endothelial cells. *Eur. Respir. J.* 8, 515-522.
- HANDEL, M.L. et GIRGIS, L. (2001) Transcription factors. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 15(5), 657-675.

- HANIU, M., ARMES, L.G., TANAKA, M., YASUNOBU, K.T., SHASTRY, B.S., WAGNER, G.C. et GUNSALUS, I.C. (1982) The primary structure of the monooxygenase cytochrome P450CAM. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105(3), 889-894.
- HANSSON, T., TINDBERG, N., INGELMAN-SUNDBERG, M. et KOHLER, C. (1990) Regional distribution of ethanol-inducible cytochrome P450 IIE1 in the rat central nervous system. *Neuroscience.* 34(2), 451-463.
- HAUPTMANN, N., GRIMSBY, J., SHIH, J.C. et CADENAS, E. (1996) The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. *Arch. Biochem. Biophys.* 335(2), 295-304.
- HAVERBACK, B.J., STUBRIN, M.I. et MAJCHER, S.I. (1966) Serotonin and related substances. *Dis. Mon.* 3-40.
- HEALY, D.G., HARKIN, A., CRYAN, J.F., KELLY, J.P. et LEONARD, B.E. (1999) Metyrapone displays antidepressant-like properties in preclinical paradigms. *Psychopharmacology (Berl)* 145, 303-308.
- HENDELES, L., BURKEY, S., BIGHLEY, L. et RICHARDSON R. (1977) Unpredictability of theophylline saliva measurements in chronic obstructive pulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 60(6), 335-338.
- HILDEBRANDT, A.G. (1972) The binding of metyrapone to cytochrome P-450 and its inhibitory action on microsomal hepatic mixed function oxidation reactions. *Biochem. Soc. Symp.* 34, 79-102.
- HONDADOSKI, P. et NEGISHI, M. (1998) Protein serine/threonine phosphatase inhibitors suppress phenobarbital-induced Cyp2b10 gene transcription in mouse primary hepatocytes. *Biochem. J.* 330 (Pt. 2), 889-895.

- HONKAKOSKI, P. et NEGISHI, M. (1998) Regulatory DNA elements of phenobarbital-responsive cytochrome P450 CYP2B genes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 12(1), 3-9.
- HONKAKOSKI, P., ZELKO, I., SUEYOSHI, T. et NEGISHI, M. (1998) The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Mol. Cell. Biol.* 18(10), 5652-5658.
- HONKAKOSKI, P., ARVELA, P., JUVONEN, R., LANG, M.A., KAIRALUOMA, M. et PELKONEN, O. (1992) Human and mouse liver coumarin 7-hydroxylases do not metabolize warfarin in vitro. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 33(3), 313-317.
- HORWITZ, L.D., WALLNER, J.S., DECKER, D.E. et BUXSER, S.E. (1996) Efficacy of lipid soluble, membrane-protective agents against hydrogen peroxide cytotoxicity in cardiac myocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 21(6), 743-753.
- HOYER, D., HANNON, J.P., MARTIN et G.R. (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71, 533-554.
- HOYER, D. et MARTIN, G. (1997) 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology.* 36(4-5), 419-428.
- HOYER, D. (1990) Serotonin 5-HT₃, 5-HT₄, and 5-HT-M receptors. *Neuropsychopharmacology.* 3(5-6), 371-383.
- HSU, K.S. & HUANG, C.C. (1998) Protein kinase C inhibitors block generation of anoxia-induced long-term potentiation. *Neuroreport* 9, 3525-3529.

- HUANG, W.T., LIN, M.T. & WONG, S.J. (1997) Staphylococcal enterotoxin A-induced fever is associated with increased circulating levels of cytokines in rabbits. *Inf. Immunol.* 65, 2656-2662.
- HUNT, C.M., WETERKAM, W.R. et STAVE, G.M. (1992) Effect of age and gender on the activity of human hepatic CYP3A. *Biochem. Pharmacol.* 44(2), 275-283.
- HUR, E., CHANG, K.Y., LEE, E., LEE, S.K. & PARK, H. (2001). Mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1 α . *Mol. Pharmacol.* 59, 1216-1224.
- HUTCHISON, J.B., WOZNIAK, A., BEYER, C., KAROLCZAK, M. et HUTCHISON, R.E. (1999) Steroid metabolising enzymes in the determination of brain gender. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69(1-6), 85-96.
- IBER, H., CHEN, Q., CHENG, P.Y. et MORGAN, E.T. (2001) Suppression of CYP2C11 gene transcription by interleukin-1 mediated by NF-kappaB binding at the transcription start site. *Arch. Biochem. Biophys.* 377(1), 187-194. Erratum in: *Arch. Biochem. Biophys.* 388(1), 178.
- INGELMAN-SUNDBERG, M., OSCARSON, M. et MCLELLAN, R.A. (1999) Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol. Sci.* 20(8), 342-349.
- IOANNIDES, C. et PARKE, D.V. (1990) The cytochrome P450 I gene family of microsomal hemoproteins and their role in the metabolic activation of chemicals. *Drug Metab. Rev.* 22(1), 1-85.

- IOANNIDES, C. et PARKE, D.V. (1987) The cytochromes P-448--a unique family of enzymes involved in chemical toxicity and carcinogenesis. *Biochem. Pharmacol.* 36(24), 4197-4207. Review. No abstract available.
- JACOBS, M.H. et SENIOR, R.M. (1974) Theophylline toxicity due to impaired theophylline degradation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 110(3), 342-345.
- JACQUES, Y., LE MAUFF, B., GODARD, A., NAULET, J., CONCINO, M., MARSH, H., IP, S. & SOULILLOU, J.P. (1990) Biochemical study of a recombinant soluble interleukin-2 receptor. Evidence for a homodimeric structure. *J. Biol. Chem.* 265, 20252-20258.
- JOHANSSON, I., EKSTROM, G., SCHOLTE, B., PUZYCKI, D., JORNVALL, H. et INGELMAN-SUNDBERG, M. (1988) Ethanol-, fasting-, and acetone-inducible cytochromes P-450 in rat liver: regulation and characteristics of enzymes belonging to the IIB and IIE gene subfamilies. *Biochemistry.* 27(6), 1925-1934.
- JONES, D.P. (1981) Hypoxia and drug metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 30, 1019-1023.
- JORDI-RACINE, A.L., ALVAREZ, E. et REICHEN, J. (1988) The effect of hypoxia on hepatic cytochromes and heme turnover in rats in vivo. *Experientia.* 44(4), 343-345.
- JOVER, R., BORT, R., GOMEZ-LECHON, M.J. et CASTELL, J.V. (1998) Re-expression of C/EBP alpha induces CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genes in HepG2 cells. *FEBS Lett.* 431(2), 227-230.
- JUN, C.D., OH, C.D., KWAK, H.J., PAE, H.O., YOO, J.C., CHOI, B.M., CHUN, J.S., PARK, R.K. et CHUNG, H.T. (1999) Overexpression of protein kinase C isoformes protects RAW 264.7 macrophages from nitric oxide-induced

apoptosis : involvement of c-Jun N-terminal kinase/Stress-activated protein kinase, p38 kinase and CPP-32 protease pathways. *J. Immun.* 162(6), 3-15.

JUNG, Y., ISAACS, J.S., LEE, S., TREPEL, J., LIU, Z.G. et NECKERS, L. (2003) Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein-dependent nuclear factor kappa B activation. *Biochem. J.* 370(Pt 3), 1011-1017.

JUNG, F., PALMER, L.A., ZHOU, N. et JOHNS, R.A. (2000) Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 86(3), 319-325. Erratum in *Circ. Res.* 90(9), E88.

JUNGERMANN, K. & KIETZMANN, T. (2000) Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver. *Hepatology* 31, 255-260.

JUNGERMANN, K. & KIETZMANN, T. (1997) Role of oxygen in the zonation of carbohydrate metabolism and gene expression in liver. *Kidney Int.* 51, 402-412.

JUNGERMANN, K. et KATZ, N. (1982) Functional hepatocellular heterogeneity. *Hepatology* 2(3), 385-395.

JURGENS, G., CHRISTENSEN, H.R., BROSEN, K., SONNE, J., LOFT, S. et OLSEN, N.V. (2002) Acute hypoxia and cytochrome P450-mediated hepatic drug metabolism in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 71(4), 214-220.

KAMATAKI, T., MAEDA, K., SHIMADA, M., KITANI, N., NAGAI, T. et KATO, R. (1985) Age-related alteration in the activities of drug-metabolizing enzymes and contents of sex-specific forms of cytochrome P-450 in liver microsomes from male and female rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 233(1), 222-228.

- KAMBE, T., TADA-KAMBE, J., KUGE, Y., YAMAGUCHI-IWAI, Y., NAGAO, M. & SASAKI, R. (2000) Retinoic acid stimulates erythropoietin gene transcription in embryonal carcinoma cells through the direct repeat of a steroid/thyroid hormone receptor response element half-site in the hypoxia-response enhancer. *Blood* 96, 3265-3271.
- KANAKARAJ, P., SCHAFER, P.H., CAVENDER, D.E., WU, Y., NGO, K., GREALISH, P.F., WADSWORTH, S.A., PETERSON, P.A., SIEKIERKA, J.J., HARRIS, C.A. et FUNG-LEUNG, W.P. (1998) Interleukin (IL)-1 receptor-associated kinase (IRAK) requirement for optimal induction of multiple IL-1 signaling pathways and IL-6 production. *J. Exp. Med.* 187(12), 2073-2079.
- KARARA, A., DISHMAN, E., BLAIR, I., FALCK, J.R. et CAPDEVILA, J.H. (1989) Endogenous epoxyeicosatrienoic acids. Cytochrome P-450 controlled stereoselectivity of the hepatic arachidonic acid epoxxygenase. *J. Biol. Chem.* 264(33), 19822-19827.
- KARIN, M., TAKAHASHI, T., KAPAHI, P., DELHASE, M., CHEN, Y., MAKRIS, C., ROTHWARF, D., BAUD, V., NATOLI, G., GUIDO, F. et LI, N. (2001) Oxidative stress and gene expression: the AP-1 and NF-kappaB connections. *Biofactors*. 15(2-4), 87-99.
- KARUZINA, I.I. & ARCHAKOV, A.I. (1994) The oxidative inactivation of cytochrome P450 in moxygenase reaction. *Free. Rad. Biol. Med.* 16, 73-97.
- KATAGIRI, M., GANGULI, B.N. et GUNSALUS, I.C. (1968) A soluble cytochrome P-450 functional in methylene hydroxylation. *J. Biol. Chem.* 243(12), 3543-3546.
- KATO, R. et TAKANAKA, A. (1968) Metabolism of drugs in old rats. I. Activities of NADPH-linked electron transport and drug-metabolizing enzyme systems in liver microsomes of old rats. *J. Pharmacol.* 18(4), 381-388.

- KATSUKI, S., ARNOLD, W., MITTAL, C. et MURAD, F. (1977) Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 3(1), 23-35.
- KAWAMOTO, T., SUEYOSHI, T., ZELKO, I., MOORE, R., WASHBURN, K. & NEGISHI, M. (1999). Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6318-6322.
- KENNETT, G.A., DICKINSON, S.L. et CURZON, G. (1985) Central serotonergic responses and behavioural adaptation to repeated immobilisation: the effect of the corticosterone synthesis inhibitor metyrapone. *Eur. J. Pharmacol.* 119, 143-152.
- KHALIL, A., FORTUN, A., HEBERT, S., JAY-GERIN, J.P., EL ABBOUYI, A., WALLACH, J. et FULOP, T.jr. (1998) Novel 21-aminosteroid U-74389G inhibits low-density lipoprotein peroxidation induced by .OH and O₂⁻. free radicals. *Life Sci.* 63(9), 769-779.
- KHATSENKO, O. et KIKKAWA, Y. (1997) Nitric oxide differentially affects constitutive cytochrome P450 isoforms in rat liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280(3), 1463-1470.
- KIKUCHI, H., HOSSAIN, A., YOSHIDA, H. et KOBAYASHI, S. (1998) Induction of cytochrome P450 1A1 by omeprazole in human HepG2 cells is protein tyrosine kinase-dependent and is not inhibited by alpha-naphthoflavone. *Arch. Biochem. Biophys.* 358(2), 351-358.
- KLINGENBERG, M. (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376-386.

- KOCAREK, T.A., SCHUETZ, E.G. et GUZELIAN, P.S. (1990) Differentiated induction of cytochrome P450b/e and P450p mRNAs by dose of phenobarbital in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Mol. Pharmacol.* 38(4), 440-444.
- KRISHNASWAMY, G. KELLEY, J., YERRA, L., SMITH, J.K. et CHI, D.S. (1999) Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *J. Interferon. Cytokine. Res.* 19(2), 91-104.
- KROON, M.E., KOOLWIJK, P., VAN DER VACHT, B. et VAN HINSBERGH, V.W. (2001) Hypoxia in combination with FGF-2 induces tube formation by human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix: involvement of at least two signal transduction pathways. *J. Cell. Sci.* 114(Pt 4), 825-833.
- KRUGER, N.J. (1994) Detection of polypeptides on immunoblots using secondary antibodies or protein A. In *Methods of molecular biology*. ed. Walker J.M. Vol. 32, pp. 215-226. Totowa, N.J. Humana Press.
- KUNTZ, H.D., STRAUB, H. et MAY, B. (1983) Theophylline elimination in congestive heart failure. *Klin. Wochenschr.* 61(21), 1105-1106.
- KURDI, J., MAURICE, H., EL-KADI, A.O.S., ONG, H., DALKARA, S., BÉLANGER, P.M. & DU SOUICH, P. (1999) Effect of hypoxia alone or combined with inflammation and 3-methylcholanthrene on hepatic cytochrome P450 in conscious rabbits. *Br. J. Pharmacol.* 128, 365-373.
- KUTSKY, P., FALCK, J.R., WEISS, G.B., MANNA, S., CHACOS, N. et CAPDEVILA, J. (1983) Effects of newly reported arachidonic acid metabolites on microsomal Ca^{++} binding, uptake and release. *Prostaglandins.* 26(1), 13-21.

- LA DU, B. (1971) Plasma esterase activity and the metabolism of drugs with ester groups. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 179, 684-694.
- LACOMBE, C. & MAYEUX, P. (1999) The molecular biology of erythropoietin. *Nephrol. Dial. Transplant.* 14 (Suppl 2), 22-28.
- LANGER, J.A., RASHIDBAIGI, A., GAROTTA, G. & KEMPNER, E. (1994) Radiation inactivation of human gamma-interferon: cellular activation requires two dimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 5818-5822.
- LEBLOND, F., GUEVIN, C., DEMERS, C., PELLERIN, I., GASCON-BARRE, M. et PICHETTE, V. (2001) Downregulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12(2), 326-332.
- LEE, J.Y., HANCOCK, A.A., WARNER, R.B., BRUNE, M.E., MEYER, M.D. et DEBERNARDIS, J.F. (1998) Cardiovascular activity of A-74283, a 5-hydroxytryptamine 1A agent, in the spontaneously hypertensive rat. *Pharmacology.* 56(1), 17-29.
- LEHMANN, J.M., MCKEE, D.D., WATSON, M.A., WILLSON, T.M., MOORE, J.T. & KLIEWER, S.A. (1998). The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J. Clin. Invest.* 102, 1016-1023.
- LEIPER, J. et VALLANCE, P. (1999) Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.* 43(3), 542-548.
- LEMASTERS, J.J., JI, S. et THURMAN, R.G. (1981) Centrilobular injury following hypoxia in isolated, perfused rat liver. *Science* 7, 661-663.

- LERET, M.L., ANTONIO, M.T. et ARAHUETES, R.M. (1998) Effect of metyrapone administration in pregnant rats on monoamine concentration in fetal brain. *Life Sci.* 62, 1943-1948.
- LETARTE, L. & DU SOUICH, P. (1984) Influence of hypercapnia and/or hypoxemia and metabolic acidosis on theophylline kinetics in the conscious rabbit. *Am. Rev. Respir. Dis.* 129, 762-766.
- LEVITCHI, M., FRADETTE, C., BLEAU, A.M. et DU SOUICH, P. Serine-threonine kinases mediate the decrease in cytochrome P450 activity produced by serum from humans with a viral infection, serum from rabbits with an aseptic inflammatory reaction and IL-6. (En préparation).
- LIN, J.H. et LU, A.Y. (1998) Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.* 35(5), 361-390.
- LOMAESTRO, B.M. et PIATEK, M.A. (1998) Update on drug interactions with azole antifungal agents. *Ann. Pharmacother.* 32, 915-28.
- LONGMUIR, I.S. et PASHKO, L. (1976) The induction of cytochrome P-450 by hypoxia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 75, 171-175.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- LU, A.Y. et COON, M.J. (1968) Role of hemoprotein P-450 in fatty acid omega-hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 243(6), 1331-1332.
- LYER, N.V., KOTCH, L.E. et AGANI, F. (1998) Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Genes Dev.* 12, 149-162.

- MACHEIN, M.R., KULLMER, J., RONICKE, V., MACHEIN, U., KRIEG, M., DAMERT, A., BREIER, G., RISAU, W. & PLATE, K.H. (1999) Differential downregulation of vascular endothelial growth factor by dexamethasone in normoxic and hypoxic rat glioma cells. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 25, 104-112.
- MALININ, N.L., BOLDIN, M.P., KOVALENKO, A.V. et WALLACH, D. (1997) MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature*. 385(6616), 540-544.
- MALTEPE, E., SCHMIDT, J.V., BAUNOCH, D., BRADFIELD, C.A. et SIMON, M.C. (1997) Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein Arnt. *Nature*. 386, 403-407.
- MARDEN, N.Y., FIALA-BEER, E., XIANG, S.H. et MURRAY, M. (2003) Role of activator protein-1 in the downregulation of the human CYP2J2 gene in hypoxia. *Biochem. J.* (version électronique avant publication).
- MARETTE, A. (2002) Mediators of cytokine-induced insulin resistance in obesity and other inflammatory settings. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 5(4), 377-383.
- MARKOVAC, J. & GOLDSTEIN, G.W. (1988). Picomolar concentrations of lead stimulate brain protein kinase C. *Nature* 334, 71-73.
- MARTIN, G.R., HOYER, D., VILLALON, C., GÖTHERT, M. et MIDDLEMISS, D.N. (2000) 5-Hydroxytryptamine receptors. The IUPHAR compendium of receptor characterization and classification. 2nd edition. IUPHAR Media, London. pp. 233-251.

- MARTIN, G.R. (1998) 5-Hydroxytryptamine receptors. The IUPHAR compendium of receptor characterization and classification. IUPHAR Media. pp.167-185.
- MASTYUGIN, V., MOSAED, S., BONAZZI, A., DUNN, M.W. et SCHWARTZMAN, M.L. (2001) Corneal epithelial VEGF and cytochrome P450 4B1 expression in a rabbit model of closed eye contact lens wear. *Curr. Eye Res.* 23(1), 1-10.
- MATHIAS, S., PENA, L.A. et KOLESNICK, R.N. (1998) Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem. J.* 335, 465-480.
- MATUSCHAK, G.M., JOHANNIS, C.A., CHEN, Z., GAYNOR, J. et LECHNER, A.J. (1996) Brief hypoxic stress downregulates E. coli-induced IL-1 alpha and IL-1 beta gene expression in perfused liver. *Am. J. Physiol.* 271(5 Pt 2), R1311-R1318.
- MAXWELL, P.H., DACHS, G.U. et GLEADE, J.M. (1997) Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8104-8109.
- MAZURE, N.M., CHEN, E.Y., LADEROUTE, K.R. & GIACCIA, A.J. (1997) Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. *Blood* 90, 3322-3331.
- MCCORD, J.M. (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* 108(8), 652-659.
- MCKINNON, R.A., HALL, P.D., QUATTROCHI, L.C., TUKEY, R.H. et MCMANUS, M.E. (1991) Localization of CYP1A1 and CYP1A2 messenger RNA in normal

human liver and in hepatocellular carcinoma by in situ hybridization. *Hepatology*. 14(5), 848-856.

MCLEOD, T.M., LOPEZ-FIGUEROA, A.L. et LOPEZ-FIGUEROA, M.O. (2001) Nitric oxide, stress, and depression. *Psychopharmacol. Bull.* 35, 24-41.

MEEHAN, R.T. (1987) Immune suppression at high altitude. *Ann. Emerg. Med.* 16(9), 974-979.

MIAN, K.B. et MARTIN, W. (1995) The inhibitory effect of 3-amino-1,2,4-triazole on relaxation induced by hydroxylamine and sodium azide but not hydrogen peroxide or glyceryl trinitrate in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* 116, 3302-3308.

MICHIELS, C., ARNOULD, T. & REMACLE, J. (2002). Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1497, 1-10.

MIEYAL, P.A., BONAZZI, A., JIANG, H., DUNN, M.W. et SCHWARTZMAN, M.L. (2000) The effect of hypoxia on endogenous corneal epithelial eicosanoids. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41(8), 2170-2176.

MIKSYS, S.L. et TYNDALE, R.F. (2002) Drug-metabolizing cytochrome P450s in the brain. *J. Psychiatry. Neurosci.* 27, 406-415.

MILLER, J.L. et TREPANIER, L.A. (2002) Inhibition by atovaquone of CYP2C9-mediated sulphamethoxazole hydroxylamine formation. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 58(1), 69-72.

MINOR, T., ISSELHARD, W. et BERGHAUS, K. (1993) Parenchymal and vascular endothelial cell injury in the hypoxic and reperfused rat liver. Evidence for

superoxide anion generation by perfusion with ferricytochrome c. *Biomed. Pharmacother.* 47(5), 213-218.

MOORE, L.B., PARKS, D.J., JONES, S.A., BLEDSOE, R.K., CONSLER, T.G., STIMMEL, J.B., GOODWIN, B., LIDDLE, C., BLANCHARD, S.G., WILLSON, T.M., COLLINS, J.L. & KLIEWER, S.A. (2000). Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J. Biol. Chem.* 275, 15122-15127.

MORGAN, E.T. et al. (2001) Cytochromes P450 flavin monooxygenases-targets and sources of nitric oxide. *Drug Met. Disp.* 29, 1366-1376.

MORGAN, E.T., ULLRICH, V., DAIBER, A., SCHMIDT, P., TAKAYA, N., SHOUN, H., MCGIFF, J.C., OYEKAN, A., HANKE, C.J., CAMPBELL, W.B., PARK, C.S., KANG, J.S., YI, H.G., CHA, Y.N., MANSUY, D. et BOUCHER, J.L. (2001) Cytochromes P450 and flavin monooxygenases--targets and sources of nitric oxide. *Drug Metab. Dispos.* 29(11), 1366-1376.

MORGAN, E.T. (1997) Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab. Rev.* 29(4), 1129-1188.

MORITZ, K.U., WALTER, R., LEOPOLD, K., HADASOVA, E., ENGEL, G. et SIEGMUND, W. (1998) Interferon- and streptolysin O-induced activation of protein kinases and inhibition of cytochrome P450-dependent monooxygenases in rats. *Pharmazie.* 53(4), 268-271.

MURAD, F. (1994) Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. *Advances in Pharmacology* 26, 19-33.

MURPHY, B.E. (1997) Antigluocorticoid therapies in major depression: a review. *Psychoneuroendocrinology* 22, (Suppl 1) S125-132.

- MURRAY, M. (1992) P450 enzymes. Inhibition mechanisms, genetic regulation and effects of liver disease. *Clin. Pharmacokinet.* 23(2), 132-146.
- MUSCETTOLA, M., GIROLAMI, L., TANGANELLI, C., FONTANI, G. & LUPO, C. (1995) Immune and endocrine aspects of behaviour in male rabbits. *Neuroimmunomodulation* 2, 155-160.
- MYLECHARANE, E.J. (1990) Mechanisms involved in serotonin-induced vasodilatation. *Blood Vessels* 27, 116-126.
- NAGANO, T. et FRIDOVICH, I. (1985) The co-oxidation of ammonia to nitrite during the aerobic xanthine oxidase reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 241(2), 596-601.
- NAKAYAMA, K., SUDO, Y., SASAKI, Y., IWATA, H., TAKAHASHI, M. & KAMATAKI, T. (2001). Studies on transcriptional regulation of CYP3A16 gene in mouse livers by application of direct DNA injection method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 820-824.
- NAKAJIMA, M., YAMAMOTO, T., NUNOYA, K., YOKOI, T., NAGASHIMA, K., INOUE, K., FUNAE, Y., SHIMADA, N., KAMATAKI, T. et KUROIWA, Y. (1996) Characterization of CYP2A6 involved in 3'-hydroxylation of cotinine in human liver microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277(2), 1010-1015.
- NAKAMURA, K., GOTO, F., RAY, W.A., MCALLISTER, C.B., JACQZ, E., WILKINSON, G.R. et BRANCH, R.A. (1985) Interethnic differences in genetic polymorphism of debrisoquin and mephenytoin hydroxylation between Japanese and Caucasian populations. *Clin. Pharmacol. Ther.* 38(4), 402-408.

- NALDINI, A., CARRARO, F., SILVESTRI, S. & BOCCI, V. (1997) Hypoxia affects cytokines production and proliferative responses by human peripheral mononuclear cells. *J. Cell. Physiol.* 173, 335-342.
- NANSEN, A., PRAVSGAARD CHRISTENSEN, J., MARKER, O. et RANDRUP THOMSEN, A. (1997) Sensitization to lipopolysaccharide in mice with asymptomatic viral infection : role of T-cell-dependent production on interferon- γ . *J. Infect. Dis.* 176, 151-157.
- NEBERT, D.W. et GONZALEZ, F.J. (1987) P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 945-993.
- NEGISHI, M., UNO, T., DARDEN, T.A., SUEYOSHI, T. et PEDERSEN, L.G. (1996) Structural flexibility and functional versatility of mammalian P450 enzymes. *FASEB J.* 10(7), 683-689.
- NEMEROFF, C.B., DE VANE, C.L. et POLLOCK, B.G. (1996) Newer antidepressants and the cytochrome P450 system. *Am. J. Psychiatry.* 153(3), 311-320.
- NG, C.Y., GHABRIAL, H., MORGAN, D.J., CHING, M.S., SMALLWOOD, R.A. et ANGUS, P.W. (2000) Impaired elimination of propranolol due to right heart failure: drug clearance in the isolated liver and its relationship to intrinsic metabolic capacity. *Drug Metab. Dispos.* 28(10), 1217-1221.
- NORRIS, M.L. & MOLLHORN, D.E. (1995). Hypoxia-induced protein binding to O₂-responsive sequences on the tyrosine hydroxylase gene. *J. Biol. Chem.* 270, 23774-23779.
- OESCH-BARTLOMOWICZ, B., ARENS, H.J., RICHTER, B., HENGSTLER, J.G. et OESCH, F. (1997) Control of the mutagenicity of aromatic amines by protein kinases and phosphatases. I. The protein phosphatase inhibitors okadaic acid and

ortho-vanadate drastically reduce the mutagenicity of aromatic amines. Arch. Toxicol. 71(10), 601-611.

OESCH-BARTLOMOWICZ, B. et OESCH, F. (1990) Phosphorylation of cytochrome P450 isoenzymes in intact hepatocytes and its importance for their function in metabolic processes. Arch. Toxicol. 64(4), 257-261.

OINONEN, T. & LINDROS, K.O. (1998) Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation. Biochem. J. 329, 17-35.

OKADO, N., NARITA, M. et NARITA, N. (2001) A biogenic amine-synapse mechanism for mental retardation and developmental disabilities. Brain Dev. 23 Suppl 1, S11-S15.

OMURA, T. & SATO, R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. 1. Evidence for its hemoprotein nature. J. Biol. Chem. 239, 2370-2378.

OU, L.C., HEALEY, J., BONKOWSKY, H.L. et SINCLAIR, P. (1980) Hepatic cytochrome P-450 in chronically hypoxemic rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. 96(3), 1128-1134.

PALMER, C.N., COATES, P.J., DAVIES, S.E., SHEPHARD, E.A. et PHILLIPS, I.R. (1992) Localization of cytochrome P-450 gene expression in normal and diseased human liver by in situ hybridization of wax-embedded archival material. Hepatology. 16(3), 682-687.

PALMER, R.M., FERRIGE, A.G. et MONCADA, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature. 327(6122), 524-526.

- PAOLINI, M., BARONE, E., CORSI, C., PAGANIN, C. et REVOLTELLA, R.P. (1991) Expression and inducibility of drug-metabolizing enzymes in novel murine liver epithelial cell lines and their ability to activate procarcinogens. *Cancer Res.* 51(1), 301-309.
- PAQUET, Y., TROTTIER, E., BEAUDET, M.J. et ANDERSON, A. (2000) Mutational analysis of the CYP2B2 phenobarbital response unit and inhibitory effect of the constitutive androstane receptor on phenobarbital responsiveness. *J. Biol. Chem.* 275(49), 38427-38436.
- PARENT, C., BELANGER, P.M., JUTRAS, L. et DU SOUICH, P. (1992) Effect of inflammation on the rabbit hepatic cytochrome P-450 isoenzymes: alterations in the kinetics and dynamics of tolbutamide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261(2), 780-787.
- PARK, H. (1999) Aromatic hydrocarbon nuclear translocator as a common component for the hypoxi- and dioxin-induced gene expression. *Mol. Cells* 9, 172-178.
- PARK, B.K., PIRMOHAMED, M. et KITTERINGHAM, N.R. (1995) The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmacol. Ther.* 68(3), 385-424.
- PARK, Y., KANEKAL, S. et KEHRER, J.P. (1991) Oxidative changes in hypoxic rat heart tissue. *Am. J. Physiol.* 260(5 Pt 2), H1395-H1405.
- PASCUSSI, J.M., GERBAL-CHALOIN, S., PICHARD-GARCIA, L., DAUJAT, M., FABRE, J.M., MAUREL, P. et VILAREM, M.J. (2000) Interleukin-6 negatively regulates the expression of pregnane X receptor and constitutively activated receptor in primary human hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274(3), 707-713.

- PATTERSON, L.H., MCKEOWN, S.R., ROBSON, T., GALLAGHER, R., RALEIGH, S.M. et ORR, S. (1999) Antitumour prodrug development using cytochrome P450 (CYP) mediated activation. *Anticancer Drug Des.* 14(6), 473-486.
- PAWLAK, D., ADAMKIEWICZ, M., MALYSZKO, J., TAKADA, A., MYSLIWIEC, M. et BUCZKO, W. (1998) Vascular and cardiac effects of DV-7028, a selective, 5-HT₂-receptor antagonist in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 32(2), 266-273.
- PELKONEN, O., MAENPAA, J., TAAVITSAINEN, P., RAUTIO, A. et RAUNIO, H. (1998) Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica.* 28(12), 1203-1253.
- PELKONEN, O. et NEBERT, D.W. (1982) Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol. Rev.* 34(2), 189-222.
- PENG, H.M., PORTER, T.D., DING, X.X. et COON, M.J. (1991) Differences in the developmental expression of rabbit cytochromes P-450 2E1 and 2E2. *Mol. Pharmacol.* 40(1), 58-62.
- PEROUTKA, S.J. (1994) Molecular biology of serotonin (5-HT) receptors. *Synapse.* 18(3), 241-260.
- PEROUTKA, S.J. (1993) 5-Hydroxytryptamine receptors. *J. Neurochem.* 60(2), 408-416.
- PESSAYRE, D. (1993) Cytochromes P450 and formation of reactive metabolites. Role in hepatotoxicity of drugs. *Therapie.* 48(6), 537-548.
- PETERS, W.H., KOCK, L., NAGENGAST, F.M. et KREMERS, P.G. (1991) Biotransformation enzymes in human intestine: critical low levels in the colon? *Gut.* 32(4), 408-412.

- PETTINATI, H.M., KRANZLER, H.R. et MADARAS, J. (2003) The status of serotonin-selective pharmacotherapy in the treatment of alcohol dependence. *Recent Dev. Alcohol.* 16, 247-262.
- PIACENTINI, L. et KARLINER, J.S. (1999) Altered gene expression during hypoxia and reoxygenation of the heart. *Pharmacol. Ther.* 83(1), 21-37.
- PIAFSKI, K.M., SITAR, D.S., RANGO, R.E. et OGILVIE, R.I. (1977) Theophylline kinetics in acute pulmonary edema. *Clin. Pharmacol. Ther.* 21(3), 310-316.
- PIKULEVA, I. et WATERMAN, M. (1999) Cytochromes P450 in synthesis of steroid hormones, bile acids, vitamin D3 and cholesterol. *Mol. Aspects Med.* 20(1-2), 33-43.
- POULOS, T.L., FINZEL, B.C., GUNSALUS, I.C., WAGNER, G.C. et KRAUT, J. (1985) The 2.6-A crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 260(30), 16122-16130.
- POWELL, J.R., VOZEH, S., HOPEWELL, P., COSTELLO, J., SCHEINER, L.B. & RIEGELMAN, S. (1978) Theophylline disposition in acutely ill hospitalized patients. The effect of smoking, heart failure, severe airway obstruction and pneumonia. *Am. Rev. Respir. Dis.* 118, 229-238.
- PRAST, H. et PHILIPPU, A. (2001) Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog. Neurobiol.* 64, 51-68.
- PRATT, J.A., JENNER, P. et MARSDEN, C.D. (1985) Comparison of the effects of benzodiazepines and other anticonvulsant drugs on synthesis and utilization of 5-HT in mouse brain. *Neuropharmacology* 24, 59-68.

- PREMKUMAR, D.R., ADHIKARY, G., OVERHOLT, J.L., SIMONSON, M.S., CHERNIACK, N.S. & PRABHAKAR, N.R. (2000). Intracellular pathways linking hypoxia to activation of c-fos and AP-1. *Adv. Exp. Med. Biol.* 475, 101-109.
- PRINS, N.H. et al. (1999) Pharmacological characterization of 5-HT₄ receptors mediating relaxation of canine isolated rectum circular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 127, 1431-1437.
- PROJEAN, D. et al. (2003) In vitro metabolism of chloroquine identification of CYP2C8, CYP3A4 and CYP2D6 as the main isoforms catalyzing N-desethylchloroquine formation. *Drug Metab. Dispos.* 31, 748-754.
- PROULX, M. et DU SOUICH, P. (1995) Inflammation-induced decrease in hepatic cytochrome P450 in conscious rabbits is accompanied by an increase in hepatic oxidative stress. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 87(2), 221-236.
- PROULX, M. & DU SOUICH, P. (1995) Acute moderate hypoxia in conscious rabbits: effect on hepatic cytochrome P450 and on reactive species. *J. Pharm. Pharmacol.* 47, 392-397.
- PYATT, D.W., ZHENG, J.H., STILLMAN, W.S. and IRONS, R.D. (1996) Inorganic lead activates NF-kappa B in primary human CD4⁺ T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 227(2), 380-385.
- QUATTROCHI, L.C. & GUZELIAN, P.S. (2001). CYP3A regulation: from pharmacology to nuclear receptors. *Drug Metab. Dispos.* 29, 615-622.
- RADI, R., CASSINA, A. et HODARA, R. (2002) Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol. Chem.* 383(3-4), 401-409.

- RAHMAN, I. (2002) Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic targets. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*. 1(3), 291-315.
- RALEIGH, S.M., WANOGHO, E., BURKE, M.D., MCKEOWN, S.R. et PATTERSON, L.H. (1998) Involvement of human cytochromes P450 (CYP) in the reductive metabolism of AQ4N, a hypoxia activated anthraquinone di-N-oxide prodrug. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 42(4), 763-767.
- RAMAGE, A.G. (2001) Central cardiovascular regulation and 5-hydroxytryptamine receptors. *Brain Res. Bull.* 56(5), 425-439.
- RAMESH, G.T., MANNA, S.K., AGGARWAL, B.B. & JADHAV, A.L. (1999). Lead activates nuclear transcription factor-kappaB, activator protein-1, and amino-terminal c-Jun kinase in pheochromocytoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 155, 280-286.
- RAPPORT, M.M., GREEN, A.A. et PAGE, I.H. (1947) Purification of the substance which is responsible for vasoconstrictor activity of serum. *Fed. Proc.* 6, 184.
- RENAUD, J.P., BOUCHER, J.L., VADON, S., DELAFORGE, M. et MANSUY, D. (1993) Particular ability of liver P450s3A to catalyze the oxidation of N omega-hydroxyarginine to citrulline and nitrogen oxides and occurrence in no synthases of a sequence very similar to the heme-binding sequence in P450s. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192(1), 53-60.
- RENDIC, S. et DI CARLO, F.J. (1997) Human cytochrome P450 enzymes : a status report summarizing their reactions, substrates, inducers and inhibitors. *Drug Metabol. Rev.* 29, 413-580.

- RHODEN, K.J., DODSON, A.M. et KY, B. (2000) Stimulation of the Na(+)-K(+) pump in cultured guinea pig airway smooth muscle cells by serotonin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293, 107-112.
- RICHARD, D.E., BERRA, E. & POUYSSEGUR, J. (1999). Angiogenesis: how a tumor adapts to hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266, 718-722.
- RICHER, M. & LAM, Y.W. (1993) Hypoxia, arterial pH and theophylline disposition. *Clin. Pharmacokinet.* 25, 283-299.
- RIDDICK, D.S. (1998) *Drugs Biotransformation*. Kallant H and Roschlau W. *Principles of Medical Pharmacology*. 6e ed., 38-54. Oxford, Oxford University Press.
- ROBERTS, E.S., LIN, H., CROWLEY, J.R., VULETICH, J.L., OSAWA, Y. et HOLLENBERG, P.F. (1998) Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine and inactivation of the catalytic activity of cytochrome P450 2B1. *Chem. Res. Toxicol.* 11(9), 1067-1074.
- ROBINSON, K.A., STEWART, C.A., PYE, Q., FLOYD, R.A. et HENSLEY, K. (1999) Basal protein phosphorylation is decreased and phosphatase activity increased by an antioxidant and a free radical trap in primary rat glia. *Arch. Biochem. Biophys.* 365(2), 211-215.
- ROMAN, R.J. (2002) P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol. Rev.* 82, 131-185
- RONIS, M.J.J., LINDROS, K.O. et INGELMAN-SUNDBERG, M. The CYP2E subfamily. Costas Ioannides. *Cytochrome P450 : metabolic and toxicological aspects*. 9, 211-241. 1996. Guilford, CRC Press.

- SALCEDA, S., BECK, I., SRINIVAS, V. & CARO, J. (1997). Complex role of protein phosphorylation in gene activation by hypoxia. *Kidney Int.* 51, 556-559.
- SALNIKOW, K., KLUZ, T., COSTA, M., PIQUEMAL, D., DEMIDENKO, Z.N., XIE, K. & BLAGOSKLONNY, M.V. (2002). The regulation of hypoxic genes by calcium involves c-Jun/AP-1, which cooperates with hypoxia-inducible factor 1 in response to hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1734-1741.
- SALVEMINI, D. et CUZZOCREA, S. (2002) Superoxide, superoxide dismutase and ischemic injury. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 3(6), 886-895.
- SAXENA, P.R., DE VRIES, P., et VILLALÓN, C.M. (1998) 5-HT₁-like receptors: a time to bid goodbye. *Trends Pharmacol. Sci.*, 19, 311-316.
- SCHUMACKER, P.T. (2002) Hypoxia, anoxia, and O₂ sensing: the search continues. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 283(5), L918-L921.
- SCHWARTZMAN, M.L. et MCGIFF, J.C. (1995) Renal cytochrome P450. *J. Lipid Mediat. Cell. Signal.* 12(2-3), 229-242.
- SCHWARTZMAN, M., FERRERI, N.R., CARROLL, M.A., SONGU-MIZE, E. et MCGIFF, J.C. (1985) Renal cytochrome P450-related arachidonate metabolite inhibits (Na⁺ + K⁺)ATPase. *Nature.* 314(6012), 620-622.
- SEGLÉN, P.O. (1976) Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell. Biol.* 13, 29-83.
- SELLMAYER, A., UEDELHOVEN, W.M., WEBER, P.C. et BONVENTRE, J.V. (1991) Endogenous non-cyclooxygenase metabolites of arachidonic acid modulate growth and mRNA levels of immediate-early response genes in rat mesangial cells. *J. Biol. Chem.* 266(6), 3800-3807.

- SEMENZA, G.L. (2002) HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol. Med.* 8(4 Suppl), S62-S67.
- SEMENZA, G.L. (2000). HIF-1: mediator of physiological and pathological responses to hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 88, 1474-1480.
- SEMENZA, G.L. (1999a). Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 15, 551-578.
- SEMENZA, G.L. (1999b). Perspectives on oxygen sensing. *Cell* 98, 281-284.
- SEMENZA, G.L., AGANI, F., BOOTH, G., FORSYTHE, J., IYER, N., JIANG, B.H., LEUNG, S., ROE, R., WIENER, C. et YU, A. (1997) Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney Int.* 51(2), 553-555.
- SESARDIC, D., PASANEN, M., PELKONEN, O. et BOOBIS, A.R. (1990) Differential expression and regulation of members of the cytochrome P450IA gene subfamily in human tissues. *Carcinogenesis.* 11(7), 1183-1188.
- SHAN, X., AW, T.Y., SMITH, E.R., INGELMAN-SUNDBERG, M., MANNERVIK, B., IYANAGI, T. et JONES, D.P. (1992) Effect of chronic hypoxia on detoxication enzymes in rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 43(11), 2421-2426.
- SHAPIRO, B.H., AGRAWAL, A.K. et PAMPORI, N.A. (1995) Gender differences in drug metabolism regulated by growth hormone. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 27(1), 9-20.
- SHAULIAN, E. et KARIN, M. (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell. Biol.* 4(5), E131-E136.

- SHEWEITA, S.A. (2000) Drug-metabolizing enzymes: mechanisms and functions. *Curr. Drug Metab.* 1(2), 107-132.
- SHIMADA, T., YAMAZAKI, H., MIMURA, M., WAKAMIYA, N., UENG, Y.F., GUENGERICH, F.P. et INUI, Y. (1996) Characterization of microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of xenobiotic chemicals in human fetal liver and adult lungs. *Drug Metab. Dispos.* 24(5), 515-522.
- SIDHU, J.S. et OMIECINSKI, C.J. (1995) cAMP-associated inhibition of phenobarbital-inducible cytochrome P450 gene expression in primary rat hepatocyte cultures. *J. Biol. Chem.* 270(21), 12762-12773.
- SILVA J.M. & NICOLL-GRIFFITH D.A. (2001) In vitro models for studying induction of cytochromes P450 enzymes. In *Drug-drug Interactions*. ed. Rodrigues A.D. pp199-201, New York : Marcel Dekker.
- SIMMS, H. & D'AMICO, R. (1996) Regulation of polymorphonuclear leukocyte cytokine receptor expression: the role of altered oxygen tensions and matrix proteins. *J. Immunol.* 157, 3605-3616.
- SMITH, B.J. (1994) SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In *Methods of molecular biology*. ed. Walker J.M. Vol. 32, pp. 23-34. Totowa, N.J. Humana Press.
- SNAWDER, J.E. et LIPSCOMB, J.C. (2000) Interindividual variance of cytochrome P450 forms in human hepatic microsomes: correlation of individual forms with xenobiotic metabolism and implications in risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32(2), 200-209.

- SNYDER, G., LATTANZIO, F., YADAGIRI, P., FALCK, J.R. et CAPDEVILA, J. (1986) 5,6-Epoxyeicosatrienoic acid mobilizes Ca^{2+} in anterior pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139(3), 1188-1194.
- SONG, B.J., VEECH, R.L. et SAENGER, P. (1990) Cytochrome P450IIE1 is elevated in lymphocytes from poorly controlled insulin-dependent diabetics. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71(4), 1036-1040.
- SPITZER, J.A. (1994) Cytokine stimulation of nitric oxide formation and differential regulation in hepatocytes and nonparenchymal cells of endotoxemic rats. *Hepatology.* 19(1), 217-228.
- SPORN, M.B. et ROBERTS, A.B. (1985) Autocrine, paracrine and endocrine mechanisms of growth control. *Cancer. Surv.* 4(4), 627-632.
- SRIVASTAVA, G., BHATNAGAR, R., VISWANATHAN, R. et VENKITASUBRAMANIAN, T.A. (1980) Microsomal & mitochondrial cytochromes in acutely hypoxic rat lung & liver. *J. Biochem. Biophys.* 17(2), 130-134.
- STOLTZ, C. & ANDERSON, A. (1999) Positive regulation of the rat CYP2B2 phenobarbital response unit by the nuclear receptor hexamer half-site.nuclear factor 1 complex. *Biochem. Pharmacol.* 57(9), 1073-1076.
- STROM, D.K., POSTLIND, H., TUKEY, R.H. (1992) Characterization of the rabbit CYP1A1 and CYP1A2 genes: developmental and dioxin-inducible expression of rabbit liver P4501A1 and P4501A2. *Arch. Biochem. Biophys.* 294, 707-716.
- SUEYOSHI, T. & NEGISHI, M. (2001). Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 123-143.

- SULTANA, C., SHEN, Y., JOHNSON, C. & KALRA, V.K. (1999). Cobalt chloride-induced signaling in endothelium leading to the augmented adherence of sickle red blood cells and transendothelial migration of monocyte-like HL-60 cells is blocked by PAF-receptor antagonist. *J. Cell. Physiol.* 179, 67-78.
- TAIRA, J., MISIK, V. et RIESZ, P. (1997) Nitric oxide formation from hydroxylamine by myoglobin and hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Acta* 1336, 502-508.
- TAKABATAKE, N., NAKAMURA, H., ABE, S., INOUE, S., HINO, T., SAITO, H., YUKI, H., KATO, S. et TOMOIKE, H. (2000) The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor-alpha system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161(4 Pt. 1), 1179-1184.
- TAKEMURA, S., MINAMIYAMA, Y., IMAOKA, S., FUNAE, Y., HIROHASHI, K., INOUE, M. & KINOSHITA, H. (1999) Hepatic cytochrome P450 is directly inactivated by nitric oxide, not by inflammatory cytokines, in the early phase of endotoxemia. *J. Hepatol.* 30, 1035-1044.
- TAYLOR, B.S., ALARCON, L.H. et BILLIAR, T.R. (1998) Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function. *Biochemistry.* 63(7), 766-781.
- TEUNISSEN, M.W., SRIVASTAVA, A.K. et BREIMER, D.D. (1982) Influence of sex and oral contraceptive steroids on antipyrine metabolite formation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 32(2), 240-246.
- THOLLON, C. et al. (2002) Consequences of reduced production of NO on vascular reactivity of porcine coronary arteries after angioplasty: importance of EDHF. *Br. J. Pharmacol.* 136, 1153-1161.

- THORPE, G.H.G., KRICKA, L.J., MOSELEY, S.B. & WHITEHEAD, T.P. (1985) Phenols as enhancers of chemiluminescent hoersradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clin. Chem.* 31, 1335-1341.
- TIAN, Y., KE, S., DENISON M.S., RABSON, A.B. et GALLO, M.A. (1999) Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J. Biol. Chem.* 274(1), 510-515.
- TOPFER, F., LENTON, L.M., BYGRAVE, F.L. et BEHM, C.A. (1995) Importance of T-cell-dependent inflammatory reactions in the decline of microsomal cytochrome P450 concentration in the livers of rats infected with *Fasciola hepatica*. *Int. J. Parasitol.* 25(10), 1259-1262.
- TOUW, D.J. (1997) Clinical implications of genetic polymorphisms and drug interactions mediated by cytochrome P-450 enzymes. *Drug Metabol. Drug Interact.* 14(2), 55-82.
- TROTTIER, E., BELZIL, A., STOLTZ, C. et ANDERSON, A. (1995) Localization of a phenobarbital-responsive element (PBRE) in the 5'-flanking region of the rat CYP2B2 gene. *Gene.* 158(2), 263-268.
- TSURU, H., NAKA, S., UCHIYAMA, T. et TERANISHI, Y. (1998) Endothelium-independent relaxant effect of 5- hydroxytryptamine (5-HT) on the isolated rabbit facial vein. *J. Smooth Muscle Res.* 34, 101-110.
- TURPAEV, K.T. (2002) Reactive oxygen species and regulation of gene expression. *Biochemistry* 67(3), 281-292.
- TWAROG, B.M. et PAGE, I.H. (1953) Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am. J. Physiol.* 175(1), 157-161.

- UCHIYAMA, T., KURABAYASHI, M., OHYAMA, Y., UTSUGI, T., AKUZAWA, N., SATO, M., TOMONO, S., KAWAZU, S. & NAGAI, R. (2000) Hypoxia induces transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene through genistein-sensitive tyrosine kinase pathways in vascular endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Bio.* 20, 1155-1161.
- URSIN, R. (2002) Serotonin and sleep. *Sleep Med. Rev.* 6(1), 55-69.
- VAN AMSTERDAM, J.G. et OPPELHUIZEN, A. (1999) Nitric oxide and biopterin in depression and stress. *Psychiatry Res.* 85(1), 33-38.
- VAN DER DOES, A.J. (2001) The effects of tryptophan depletion on mood and psychiatric symptoms. *J. Affect. Disord.* 64(2-3), 107-119.
- VAN DER LOO, B., LABUGGER, R., SKEPPER, J.N., BACHSCHMID, M., KILO, J., POWELL, J.M., PALACIOS-CALLENDER, M., ERUSALIMSKY, J.D., QUASCHNING, T., MALINSKI, T., GYGI, D., ULLRICH, V. et LUSCHER, T.F. (2000) Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J. Exp. Med.* 192(12), 1731-1744.
- VARGIU, C., BELLIARDO, S., CRAVANZOLA, C. GRILLO, M.A. et COLOMBATTO, S. (2000) Oxygen regulation of rat hepatocyte iNOS gene expression. *J. Hepatol.* 32(4), 567-573.
- VILLARD, P.H., SEREE, E., LACARELLE, B., THERENE-FENOGLIO, M.C., BARRA, Y., ATTOLINI, L., BRUGUEROLE, B., DURAND, A. et CATALIN, J. (1994) Effect of cigarette smoke on hepatic and pulmonary cytochromes P450 in mouse: evidence for CYP2E1 induction in lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202(3), 1731-1737.

- WALTER-SACK, I. Et KLOTZ, U. (1996) Influence of diet and nutritional status on drug metabolism. *Clin. Pharmacokinet.* 31(1), 47-64.
- WANG, G.L., JIANG, B.H. & SEMENZA, G.L. (1995). Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 669-675.
- WANG, T., ZHANG, X. et LI, J.J. (2002) The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int. Immunopharmacol.* 2(11), 1509-1520.
- WEISSMANN, N., TADIC, A., HANZE, J., ROSE, F., WINTERHALDER, S., NOLLEN, M., SCHERMULY, RT., GHOFrani, H.A., SEEGER, W. & GRIMMINGER, F. (2000) Hypoxic vasoconstriction in intact lungs: a role for NADPH oxidase-derived H₂O₂? *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279, L683-690.
- WENGER, R.H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *F.A.S.E.B. J.* 16, 1151-1162.
- WENGER, R.H., ROLFS, A., MARTI, H.H., BAUER, C. et GASSMANN, M. (1995) Hypoxia, a novel inducer of acute phase gene expression in a human hepatoma cell line. *J. Biol. Chem.* 270(46), 27865-27870.
- WESSELBORG, S., BAUER, M.K., VOGT, M., SCHMITZ, M.L. et SCHULZE-OSTHOFF, K. (1997) Activation of transcription factor NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase is mediated by distinct and separate stress effector pathways. *J. Biol. Chem.* 272(19), 12422-12429.
- WHITLOCK, J.P. jr (1999) Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 103-125.

- WIBBENMEYER, L.A., LECHNER, A.J., MUNOZ, C.F. et MATUSCHAK, G.M. (1995) Downregulation of E. coli-induced TNF-alpha expression in perfused liver by hypoxia-reoxygenation. *Am. J. Physiol.* 268(2 Pt 1), G311-G319.
- WINK, D.A., OSAWA, Y., DARBYSHIRE, J.F., JONES, C.R., ESHENAUER, S.C. et NIMS, R.W. (1993) Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Arch. Biochem. Biophys.* 300(1), 115-123.
- WOOLLEY, D.W. et GOMMI, B.W. (1963) Transport of calcium into muscles in response to serotonin and other hormones. *Biochim. Biophys. Acta.* 74, 781-782
- WORTELBOER, H.M., DE KRUIF, C.A., VAN IERSEL, A.A., FALKE, H.E., NOORDHOEK, J. et BLAAUBOER, B.J. (1991) Comparison of cytochrome P450 isoenzyme profiles in rat liver and hepatocyte cultures. The effects of model inducers on apoproteins and biotransformation activities. *Biochem. Pharmacol.* 42(2), 381-390.
- WRIGHTON, S.A., VANDENBRANDEN, M., STEVENS, J.C., SHIPLEY, L.A., RING, B.J., RETTIE, A.E. et CASHMAN, J.R. (1993) In vitro methods for assessing human hepatic drug metabolism: their use in drug development. *Drug Metab. Rev.* 25(4), 453-484.
- www.pharmacorama.com
- www.statcan.ca
- YAMADA, J., SUGIMOTO, Y. et KUNITOMO, M. (2000) A nitric oxide synthase inhibitor reduces hyperphagia induced in rats by the 5-HT(1A) receptor agonist, 8-OH-DPAT, independently of hypothalamic serotonin metabolism. *Eur. J. Pharmacol.* 402, 247-250.

- YAMADA, K., NODA, Y., NAKAYAMA, S., KOMORI, Y., SUGIHARA, H., HASEGAWA, T. et NABESHIMA, T. (1995) Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. *Br. J. Pharmacol.* 115, 852-858.
- YAMAGUCHI, N. (1993) In vivo evidence for adrenal catecholamine release mediated by nonnicotinic mechanism: local medullary effect of VIP. *Am. J. Physiol. Regulatory. Integrative Comp. Physiol.* 265, R766-R771.
- YAMAZAKI, H., MIMURA, M., SUGAHARA, C. et SHIMADA, T. (1994) Catalytic roles of rat and human cytochrome P450 2A enzymes in testosterone 7 α - and coumarin 7-hydroxylations. *Biochem. Pharmacol.* 48(7), 1524-1527.
- YANG, B., GRAHAM, L., DIKALOV, S., MASON, R.P., FALCK, J.R., LIAO, J.K. et ZELDIN, D.C. (2001) Overexpression of cytochrome P450 CYP2J2 protects against hypoxia-reoxygenation injury in cultured bovine aortic endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* 60(2), 310-320.
- YUASA, T., OHNO, S., KEHRL, J.H. et KYRIAKIS, J.M. (1998) Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase 1 and SAPK while receptor interacting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase kinase upstream of MKK6 and p38. *J. Biol. Chem.* 273(35), 22681-22692.
- ZELKO, I. et NEGISHI, M. (2000) Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P450 genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277(1), 1-6.

ZIFA, E. et FILLION, G. (1992) 5-Hydroxytryptamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 44(3), 401-458.